

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 749**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012 PCT/US2012/045017**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13003761**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012 E 12804528 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2726101**

54 Título: **Inhibidores de la activación de células T**

30 Prioridad:

30.06.2011 US 201161503282 P

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

27.12.2018

73 Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**ZHU, YUNXIANG;
KARMAN, JOZSEF;
WEI, RONNIE;
JIANG, CANWEN y
CHENG, SENG**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 694 749 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

Inhibidores de la activación de células T.

Antecedentes de la invención

5 La terapia celular que usa células T reguladoras (Tregs) recién aisladas, expandidas *ex vivo* o inducidas *in vitro* en modelos de enfermedades autoinmunes o trasplantes de órganos han demostrado que la transferencia adoptiva de Tregs puede restaurar el equilibrio de Tregs frente a células T efectoras, controlando así la autoinmunidad asociada con estas enfermedades (Allan et al., (2008) *Immunol. Rev.* 223:391-421; Jiang et al., (2006) *Expert review of clinical immunology* 2:387-392; Riley et al., (2009) *Immunity* 30:656-665; Tang et al., (2012) *Journal of molecular cell biology* 4:11-21). Sin embargo, el uso de transferencia adoptiva como una estrategia terapéutica presenta varios desafíos para el traslado a la clínica. El número de Tregs autólogas que pueden aislarse de la sangre periférica de un sujeto humano es limitante y la expansión *ex vivo* extensiva de las Tregs puede alterar su funcionalidad y/o pureza. Como las Tregs aisladas son policlonales, pueden ejercer una función supresora panimmune en las células T efectoras que no son diana. De forma importante, la plasticidad de las Tregs plantea un desafío significativo (Bluestone et al., (2009) *Nat Rev Immunol* 9:811-816; Zhou et al., (2009a) *Curr Opin Immunol* 21:281-285), ya que las Tregs transferidas de forma adoptiva pueden perder la expresión Foxp3 y re-diferenciarse en células Th17 (Koenen et al., (2008) *Blood* 112:2340-2352) o células T de memoria patógenas (Zhou et al., (2009b) *Nat Immunol* 10:1000-1007) que elevan el riesgo de agravar la autoinmunidad o inflamación.

20 Un agente terapéutico que induce la generación de Tregs de una manera específica para un antígeno *in situ* tendría ventajas sobre la terapia celular Treg adoptiva. El antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4; CD152) es un regulador negativo bien establecido de la respuesta de células T, es importante para el mantenimiento de la homeostasis y auto-tolerancia de células T. El CTLA-4 es homólogo a la molécula co-estimuladora CD28 y comparte los mismos ligandos, CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), que se expresan en la superficie de células que presentan antígenos (APCs, en inglés). Sin embargo, la unión diferencial de CD80/CD86 en las APCs a CD28 y CTLA-4 en las células T efectoras lleva a resultados opuestos, con CD28 desencadenando la activación de células T y CTLA-4 provocando la inhibición de células T.

30 Porque CD28 se expresa de forma constitutiva en células T y la expresión de CTLA-4 solo se induce después de la activación de células T, teniendo un pico 2-3 días después (Jago et al., (2004) *Clinical & Experimental Immunology*, 136:463-471), la activación extensiva de células T habría ocurrido antes de la unión de CTLA-4. Por tanto, el papel principal de CTLA-4 es actuar como una salvaguarda frente a una respuesta excesiva de células T más que para inhibir la activación de células T. Sin embargo, la unión temprana de CTLA-4 mediante su ligando y su posterior reticulando al receptor de células T (TCR) puede disminuir de forma prematura la señalización del TCR, provocando la inhibición de las células T y menor respuesta, o anergia. Este concepto se ha validado experimentalmente usando una variedad de métodos, que incluyen los siguientes: (i) reticular anticuerpos que activan las células T (anti-CD3/antiCD28) usando un anticuerpo anti-CTLA-4 agonista mediante co-inmovilización en una perla o por medio de un anticuerpo secundario (Blair et al., (1998) *J. Immunol.* 160:12-15; Krummel y Allison, (1996) *J Exp Med* 183:2533-2540; Walunas et al., (1996) *J. Exp. Med.* 183:2541-2550); (ii) desarrollar de forma molecular un scFv agonista unido a la superficie frente a CTLA-4 en una APC (Fife et al., (2006) *J. Clin. Invest.* 116(8):2252-61; Griffin et al; (2001) *J. Immunol. Methods.* 248(1-2):77-90; Griffin et al., (2000) *J. Immunol.* 164(9):4433-42; y (iii) reticular de forma química anticuerpos que reconocen antígenos específicos en una APC a un anticuerpo anti-CTLA-4 agonista (Li et al., (2007) *J. Immunol.* 179(8):5191-203; Rao et al., (2001) *Clin. Immunol.* 101(2):136-45; Vasu et al., (2004) *J. Immunol.* 173(4):2866-76). Fife et al., (2006) *J. Clin. Invest.* 116(8):2252-2261 describe un ratón transgénico (Tg) que expresa un anti-CTLA-4 Ab (scFv) unido a la membrana, de cadena sencilla, en células B. Expresa que las células B de los ratones Tg+ scFv (scCTLA4+) evitaron la proliferación de células T y la producción de citoquina en reacciones de linfocitos mezclados.

45 La restauración del equilibrio de Tregs frente a células T efectoras es un medio prometedor de tratamiento de la enfermedad autoinmune. Sin embargo, la terapia celular que implica la transferencia de Tregs tiene ciertas limitaciones. Por consiguiente, se necesitan de forma urgente agentes terapéuticos que puedan inducir la generación de Tregs (p. ej., CTLA-4) de una manera específica a un antígeno para el tratamiento de la enfermedad autoinmune.

Compendio de la invención

50 La presente invención se refiere a ligandos que reticular el antígeno-4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) unido al ligando al receptor de la célula T (TCR) durante la fase temprana de la activación de células T y por consiguiente atenúan la señalización del TCR, llevando a la inhibición de células T. Para desarrollar un agente que pueda inhibir la activación de células T, se generó una proteína de fusión biespecífica que comprende restos que se unen de forma selectiva y activan el CTLA-4 y lo co-ligan al TCR. En contraste con las estrategias de la técnica anterior, la proteína de fusión biespecífica se desarrolló para reticular MHC a CTLA-4; ambos son arrastrados entonces al TCR, generando el complejo tri-molecular CTLA-4/MHCII/TCR en las sinapsis inmunes.

Reticular el antígeno-4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) unido al ligando al TCR con una proteína de fusión biespecífica (BsB) que comprende un CD80 de ratón mutante y antígeno-3 de activación del linfocito en una MLR

alógeno atenuó la señalización del TCR y la diferenciación de células T directas hacia las células T reguladoras (Tregs) Foxp3⁺. Como se describe en la presente memoria, las Tregs específicas de un antígeno pueden inducirse también en una configuración específica para un antígeno. El tratamiento de ratones diabéticos no obesos (NOD) con un corto tratamiento de BsB retrasó de forma moderada el comienzo de la diabetes tipo 1 autoinmune (DT1) con un aumento temporal de Tregs en sangre. Sin embargo, un tratamiento más largo de animales NOD con BsB retrasó de forma significativa el comienzo de la enfermedad además de reducir la incidencia de animales que se presentan con diabetes. El análisis histopatológico de los páncreas de ratones tratados con BsB que permanecieron no diabéticos reveló la presencia de Tregs que se entremezclaron con otras células T CD3⁺ y leucocitos que no son células T alrededor de los islotes. Esta peri-insulitis se asoció con insulitis invasiva mínima y la no destacada destrucción de las células β que producen insulina. Por consiguiente, las proteínas bifuncionales capaces de unir CTLA-4 y MHCII y co-ligarlo de forma indirecta al TCR pueden inducir Tregs específicos de antígenos in vivo para proteger a los ratones de DT1 u otras enfermedades autoinmunes.

En particular, la descripción describe proteínas de fusión biespecíficas que reticularan CTLA-4 al complejo pMHCII. Por ejemplo, se describe una proteína de fusión biespecífica que comprende un CD80 de ratón mutante (CD80w88a) y antígeno-3 de activación de linfocitos (LAG-3) que se desarrolla para unir simultáneamente CTLA-4 y reticularlo al TCR por medio de pMHCII. En un primer aspecto, por lo tanto, se proporciona un compuesto biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC.

En un aspecto, la descripción proporciona un compuesto biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC. El compuesto biológico biespecífico según la descripción es capaz de reticular CTLA-4, presente en las células T, con el complejo péptido MHC (pMHC) en células que presentan el antígeno (APC). El complejo péptido MHC se une mediante el receptor de células T (TCR) parecido en células T, que significa que el compuesto biológico biespecífico según la descripción da lugar a un complejo CTLA-4/MHC/TCR tripartito.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona una proteína de fusión biespecífica que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC, en el que el ligando específico para CTLA-4 y el ligando específico para el complejo pMHC están separados por un conector. Se describen más realizaciones de la presente invención en las reivindicaciones anexas.

Como se usa en la presente memoria el término "realización" se refiere a realizaciones de la invención y/o la descripción como sea apropiado.

En varias realizaciones de los aspectos delineados en la presente memoria, el ligando específico para CTLA-4 se selecciona a partir de un anticuerpo específico para CTLA-4, y CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2). En una realización particular, el anticuerpo específico para CTLA-4, y CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) es un anticuerpo agonista. Los anticuerpos específicos para CTLA-4 pueden desarrollarse, y tanto CD80 como CD86 son ligandos naturales para CTLA-4. En un aspecto, se usa CD80 o un mutante del mismo, ya que CD80 se une preferentemente a CTLA-4 sobre CD28, y por consiguiente promueve la inactivación de células T en oposición a la activación. En varias realizaciones de los aspectos delineados en la presente memoria, el ligando específico para el complejo pMHC puede seleccionarse de un anticuerpo anti-MHC y LAG-3. El polipéptido LAG-3 es un ligando natural para la proteína MHCII. En una realización, el MHC es MHC-II (que interactúa con células T CD4⁺). En otra realización el MHC es MHC-I, que interactúa con células T CD8⁺.

En el compuesto biológico biespecífico según la descripción, el ligando específico para CTLA-4 y el ligando específico para el complejo pMHC están separados preferiblemente por un conector. El conector puede tomar la forma de una o más de una secuencia de poliaminoácido y un dominio Fc de anticuerpo. Una secuencia de poliaminoácido adecuada es G9 (Gly-9). En varias realizaciones de los aspectos delineados en la presente memoria, el ligando específico para CTLA-4 es CD80, o un mutante del mismo que se muta para aumentar la especificidad para CTLA-4 sobre CD28. En una realización, el CD80 mutado comprende una o más mutaciones seleccionadas de W88A, K75G, K75V, S112G, R126S, R126D, G127L, S193A, y S204A, usando la numeración de secuencia en el precursor CD80 de ratón, o su contrapartidas CD80 humano (W84A, K71G, K71V, S109G, R123S, R123D, G124L, S190A y S201A) y además R63A, M81A, N97A, E196A.

En una realización, el compuesto biológico biespecífico comprende CD80, que comprende la mutación W84A (humana) o W88A (ratón).

En una realización particular, el ligando específico para el complejo MHCII es LAG-3. De forma ventajosa, LAG-3 se muta para aumentar la especificidad para pMHCII. Por ejemplo, LAG-3 comprende una o más mutaciones seleccionadas de R73E, R75A, R75E y R76E (Huard et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(11):5744-5749. En una realización, LAG-3 comprende la mutación R75E.

La unión preferente de la proteína de fusión biespecífica a CTLA-4 sobre CD28 se consiguió usando CD80 mutante (CD80w88a), que contiene alanina en vez de triptófano en el aminoácido 88 (numerado en el CD80 de ratón), como el ligando. CD80w88a se une a CTLA-4 pero muestra una mínima afinidad por CD28 (Wu et al., (1997), *J. Exp. Med.* 185:1327-1335).

El gen-3 de activación del linfocito (LAG-3), un ligando natural de MHCII, se seleccionó como el otro componente de unión de la proteína de fusión biespecífica (Baixeras et al., (1992) *J. Exp. Med.* 176:327-337; Triebel et al., (1990) *J. Exp. Med.* 171:1393-1405). Se muestra que una proteína de fusión con dicha bi-funcionalidad inhibe de forma efectiva la activación de células T y estimula la producción de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β . De forma más importante, esta proteína de fusión biespecífica también dirigió la diferenciación de células T a Tregs F oxp3^+ altamente supresoras. Esto no ocurrió cuando se usó en cambio el bien establecido inhibidor co-estimulador CTLA-4Ig (Bluestone et al., (2006) *Immunity* 24:233-238; Linsley y Nadler (2009) *Immunol. Rev.* 229:307-321). Por lo tanto, la unión temprana de CTLA-4 y el reticulado de CTLA-4 al TCR durante la activación de células T podría influir de forma activa en la diferenciación de células T. Dichas proteínas de fusión biespecíficas podrían representar por consiguiente una nueva clase de compuestos biológicos que podrían usarse para controlar las respuestas excesivas de células T en las enfermedades autoinmunes.

En un aspecto adicional de la descripción, se proporciona el uso de un compuesto biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC según el primer aspecto de la invención, para la inducción de inmunotolerancia de una célula T poniendo en contacto dicha célula T con una célula que presenta un antígeno que está presentando un péptido derivado de dicho antígeno complejado con una molécula MHC y dicho compuesto biológico biespecífico. En un aspecto adicional de la descripción, se proporciona el uso de un compuesto biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC según el primer aspecto de la invención, en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad autoinmune y rechazo al trasplante.

Por ejemplo, la enfermedad autoinmune es diabetes tipo 1 (DT1), lupus eritomatoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR) y enfermedad intestinal inflamatoria (EII) (que incluye colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC)), esclerosis múltiple (EM), escleroderma y otras enfermedades y trastornos, tales como PV (pénfigo vulgar), soriasis, dermatitis atópica, enfermedad celíaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves (tiroides), síndrome de Sjögren, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Addison, granulomatosis de Wegener, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmune, polimialgia reumática, fenómeno de Raynaud, arteritis temporal, arteritis de células gigantes, anemia hemolítica autoinmune, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, enfermedad de Behçet, cirrosis biliar primaria, uveítis, miocarditis, fiebre reumática, espondilitis anquilosante, glomerulonefritis, sarcoidosis, dermatomiositis, miastenia grave, polimiositis, alopecia areata y vitíligo.

En un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un método de inducir la inmunotolerancia de una célula T a un antígeno, que comprende poner en contacto dicha célula T con una célula que presenta el antígeno que está presentando un péptido derivado de dicho antígeno complejado con una molécula MHC y un compuesto biológico biespecífico según el primer aspecto de la invención.

En un aspecto adicional de la descripción, se proporciona un método para tratar a un sujeto que padece una condición seleccionada de una enfermedad autoinmune y rechazo al trasplante, que comprende las etapas de administrar a un sujeto que lo necesita un compuesto biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC según el primer aspecto de la invención.

Por ejemplo, la enfermedad autoinmune es diabetes tipo 1 (DT1).

Descripción de las figuras

Figura 1. Diseños de BsB y BsBA. (A) Dibujos esquemáticos de las proteínas de fusión BsB (compuestos biológicos biespecíficos) y BsBA. (B) Dibujo esquemático de pMHCII, del TCR y las moléculas co-estimuladoras en la sinapsis inmune, además del esquema propuesto para el reticulado mediado por BsB de CTLA-4 al TCR por medio del complejo trimolecular CTLA-4/MHC11/TCR. La proteína de fusión se une a CTLA-4 y liga indirectamente al TCR por medio de la unión a MHCII en la sinapsis inmune. Los dos lados sólidos del triángulo indican reticulado de MHCII y CTLA-4 además de MHCII y TCR; el lado discontinuo representa la unión de CTLA-4 a TCR. La línea de puntos indica la inhibición de la señalización de TCR por CTLA-4 unido a BsB. El dibujo esquemático muestra que la acción de BsBA es similar al del BsB excepto, que es incapaz de ligar al TCR.

Figura 2. Inhibición de la activación de células T alogénicas por BsB en una reacción mixta de linfocitos. Las células T no tratadas anteriormente procedentes de ratones C57BL/6 y las APCs de BALB/c tratadas con LPS e irradiadas se mezclaron con los constructos de prueba durante 2 días. Los medios de cultivo se cosecharon después y se probaron para IL-2. Solo BsB y CTLA-4Ig inhibieron la activación de células T, como se indica por una cantidad disminuida de IL-2 en el medio. La figura es representativa de más de cinco estudios independientes aunque similares.

Figura 3. Inducción de Tregs F oxp3^+ y producción de IL-10 y TGF- β mediante BsB. (A) Las reacciones mixtas de linfocitos alogénicas se establecieron como se describe en la leyenda de la Figura 2, usando células CD4 $^+$ C62L $^{\text{allo}}$ CD25 $^+$ GFP $^+$ no tratadas anteriormente que se han aislado de ratones con genes externos insertados de F oxp3 -EGFP en presencia de los constructos de prueba. Cinco días después de la activación, las células T CD4 $^+$ se analizaron para la expresión de GFP por citometría de flujo. Las Tregs se agruparon como células GFP $^+$ y CD25 $^+$.

Solo el tratamiento con BsB llevó a la expresión de GFP, que indica la inducción de Tregs Foxp3⁺ (panel izquierdo medio). Los medios de cultivo se recogieron para análisis de citoquinas (paneles derechos), que revelaron niveles elevados de IL-10 y TGF-β en presencia de BsB. Los datos son representativos de numerosos estudios independientes aunque similares. (B) La necesidad de TGF-β autocrino para la inducción de Treg se indica por el bloqueo completo de la inducción de Treg en presencia de un anticuerpo de bloqueo a TGF-β, mientras el Ab de control no impactó de forma notable en la inducción de Treg.

Figura 4. Inducción mediada por BsB de Tregs específicas de antígeno *in vitro*. (A) Inducción *in vitro* de Tregs específicas de Ova₂₃₃₋₃₃₉. Las células T OT-II no tratadas anteriormente se mezclaron con APC singénicas activadas con LPS e irradiadas en presencia de 0,5 μg/ml de péptido Ova₂₃₃₋₃₃₉. Se añadieron entonces mIgG2a de control, BsB, y BsB más un anticuerpo anti-TGF-β (αTGF-β) y se probaron como se indica (paneles izquierdos). Las células se cultivaron durante 5 días y después se marcaron con anticuerpos anti-CD25 y anti-Foxp3 antes de analizarse por citometría de flujo. Los niveles de IL-2, IL-10 y TGF-β en los medios de cultivos se probaron por ELISA (paneles derechos). (B) Monitorización de la proliferación de Tregs inducidas. Los estudios se realizaron como en A excepto que células T OT-II no tratadas anteriormente se pre-marcaron con CFSE antes de mezclarse con las APCs. Las células se agruparon en canales fluorescentes de Foxp3 y CFSE.

Figura 5. Función supresora de Tregs inducidas por BsB. (A) Se purificaron las Tregs inducidas por BsB o TGF-β mediante citometría de flujo y se mezclaron con células T respondedoras no tratadas anteriormente marcadas con CFSE preparadas a partir de ratones C57BL/6 a las relaciones indicadas en pocillos de cultivos polarizados (columnas rellenas) o pocillos de cultivo normales (columnas sombreadas). Se añadieron APCs de BALB/c alogénicas tratadas con LPS para estimular la activación de células T. Los resultados (media + desviación estándar) indican el porcentaje de proliferación de células T respondedoras (Tresp), en base a la dilución de CFSE sin Tregs (Tresp + solo APC) ajustados a 100%. (B) Se añadieron anticuerpos anti-IL-10 y anti-TGF-β a las células en los pocillos de cultivo normales a una relación de Tresp:Treg de 1:1 para determinar la contribución de las citoquinas a la proliferación de células T. El anticuerpo anti-TGF-β inhibió parcialmente la función supresora de Tregs inducidas por TGF-β (panel izquierdo) aunque no afectaron a las Tregs inducidas por BsB (panel derecho). La figura es representativa de más de tres estudios independientes aunque similares.

Figura 6. Disminución de la fosforilación de AKT y mTOR mediante BsB. Las células T no tratadas anteriormente se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo co-recubiertas con anti-CD3, anti-CD28 y BsB, IgG de ratón (mIgG) o PD-L1 de ratón (mPD-L1) durante 18 h. Las células estimadas no activadas se cultivaron en pocillos recubiertos solo con IgG. El estado de fosforilación de AKT y mTOR se monitorizó después por citometría de flujo después de tefir con anticuerpos marcados de forma fluorescente a los AKT y mTOR fosforilados. MFI indica la intensidad fluorescente media. Esta figura representa uno de tres experimentos independientes.

Figura 7. Expresión de Foxp3 sostenida en Tregs en respuesta a la estimulación continua con BsB. Se co-recubrieron placas de 96 pocillos de fondo redondo con anti-CD3, anti-CD28 y BsB o IgG de ratón. Las células T no tratadas anteriormente de ratones con genes externos insertados Foxp3-EGFP se cultivaron durante 5 días para inducir Tregs (paneles izquierdos), que se purificaron después a partir de células tratadas con BsB (cuadrado rojo) y se re-estimularon en otro grupo de cultivo en pocillos co-recubiertos, como anteriormente, durante 5 días, antes del análisis por citometría de flujo para células GFP⁺. Cultivar de nuevo Tregs purificadas con el control IgG de ratón durante 5 días dio por resultado una pérdida de expresión de Foxp3⁺ en ~60% de células (cuadrante superior derecho de panel superior derecho), mientras que menos del 7% de las Tregs cultivadas de nuevo con BsB habían perdido la expresión de Foxp3⁺ (cuadrante superior derecho del panel inferior derecho). Esta figura representa uno de tres experimentos independientes.

Figura 8. Farmacocinéticas de BsB *in vivo* y análisis bioquímico. (A) Perfil farmacocinético de BsB en ratones. Se dosificaron ratones C57BL/6 normales (n=5) de forma intraperitoneal con 20 mg/kg de BsB. Se recogieron muestras de sangre a diferentes puntos temporales indicados y los niveles de niveles de BsB se determinaron usando ELISA. (B) Comparación de la unión de BsB e IgG2a de ratón a FcRn. Se inmovilizaron los FcRn a un chip Biacore. Se cargó BsB o IgG2a de ratón de control en el chip a diversas concentraciones y entonces se grabaron las señales.

Figura 9. Análisis de glucosilación unida a asparagina en BsB. La secuencia de aminoácidos de BsB se envió al servidor NetNGlyc 1.0 para la predicción de sitios de glucosilación unidos a Asn. Se predijeron un total de 10 sitios de glucosilación unidos a Asn (indicados N); otros aminoácidos se presentan como puntos. La composición de monosacáridos de BsB se realizó también para determinar la composición de los glucanos fucosa (Fuc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa (Gal), manosa (Man), ácido siálico (ácido N-acetilneurámico). Una relación de ácido siálico:galactosa de 0,68 indica que aproximadamente un tercio de los residuos de galactosa están disponibles para unirse al receptor de asialoglucoproteína.

Figura 10. El tratamiento de ratones no diabéticos (NOD) con BsB retrasó el comienzo de la diabetes tipo 1 (DT1) en un paradigma de tratamiento de prevención tardía. (A) Niveles de Tregs Foxp3⁺ en la sangre de ratones NOD tratados con BsB (círculos cerrados, n=15) y ratones NOD de control tratados con solución salina (triángulos cerrados, n=14). Hubo un aumento moderado aunque significativo en el número de Tregs en los animales tratados con BsB sobre el notado en los animales de control. (B) Incidencias acumulativas de diabetes manifiesta en animales NOD tratados con BsB (círculos rellenos) o solución salina (triángulos rellenos).

Figura 11. El tratamiento de ratones NOD con BsB retrasó el comienzo de DT1 en un paradigma de tratamiento de prevención temprana. (A) Niveles de Tregs Foxp3⁺ en la sangre de ratones tratados con BsB (círculos cerrados, n=10), solución salina (triángulos cerrados, n=10), CTLA-4Ig (cuadrados cerrados, n=10) e IgG2a de ratón (cuadrados abiertos, n=10). No se detectó aumento en el número de Tregs Foxp3⁺ después de dos semanas de tratamiento con BsB cuando se compara con los controles tratados con solución salina o mIgG2a. Sin embargo, el tratamiento con CTLA-4Ig dio por resultado una disminución estadísticamente significativa en el número de Tregs Foxp3⁺ en la sangre. (B) Incidencias acumulativas de diabetes manifiesta en animales tratados con BsB o controles. El tratamiento con BsB dio por resultado un retraso significativo en el comienzo de DT1 cuando se compara con los grupos de control tratados con solución salina o IgG2a de ratón antes de 24 semanas de edad ($p=0,04$). Sin embargo, no se notó una diferencia significativa entre los grupos al final del estudio. Los datos representan uno de dos estudios separados con resultados similares, con un total de 26 ratones NOD en cada grupo.

Figura 12. El tratamiento a más largo plazo de ratones NOD con BsB retrasó de forma significativa el comienzo de DT1 en ratones NOD. (A) Incidencias acumulativas de diabetes manifiesta en ratones tratados con BsB (n=16) y ratones no tratados (n=16). El tratamiento con BsB redujo significativamente la incidencia de DT1 cuando se compara con los tratados con solución salina ($p<0,01$). (B) Análisis histopatológico de tejidos pancreáticos de animales tratados con solución salina o BsB. Los paneles a-c representan secciones de ratones tratados con solución salina que permanecen no diabéticos con H&E, un anticuerpo para la insulina, o anti-CD3 y forkhead box P3 (Foxp3), respectivamente. Se anotaron observaciones similares en ratones NOD tratados con BsB que permanecieron libres de enfermedad. No se anotó evidencia de infiltración o insulinitis en cualquiera de las secciones; unas pocas Tregs Foxp3⁺ pueden estar presentes (flechas en el panel c). Los paneles d-f representan secciones pancreáticas de animales NOD diabéticos. La insulinitis invasiva era claramente evidente y las células β que producen insulina estaban completamente destruidas. (e) También se detectaron algunas infiltraciones de células T CD3⁺, junto con algunas Tregs y muchos leucocitos de no son células T con núcleos azules. (f) Los paneles g-i muestran islotes de animales tratados con BsB que permanecen no diabéticos mostraron peri-insulinitis característica. Se anotaron infiltraciones de leucocitos aunque estaban restringidas a la periferia de los islotes. Además, no hubo una destrucción notable de las células β que producen insulina. La mayoría de los leucocitos en la periferia eran células que no son T (núcleos azules). La inserción ampliada (panel j, representa un cuadrado rojo en i) indicó Tregs Foxp3⁺ (cabeza de flecha amarilla) que estaban entremezcladas con otras células T CD3⁺ y leucocitos que no son células T (núcleos azules) en la periferia de los islotes. Las imágenes se obtuvieron con un objetivo 40x; la inserción se obtuvo con un objetivo 60x, que se amplió después adicionalmente 3x de forma digital.

Descripción detallada de la invención

A menos que se indique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que se entienden normalmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

Los métodos, dispositivos y materiales adecuados para cada uso se describen ahora. Todas las publicaciones citadas en la presente memoria se mencionan con el propósito de describir y divulgar las metodologías, reactivos y herramientas presentadas en las publicaciones que podrían usarse en conexión con la invención.

Los métodos y técnicas de la presente solicitud se realizan generalmente según los métodos convencionales bien conocidos por los expertos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y se tratan a lo largo de la presente memoria a menos que se indique otra cosa. Dichas técnicas se explican enteramente en la bibliografía. Véase, p.ej. Gennaro, A.R., ed. (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a ed., Mack Publishing Co.; Hardman, J.G., Limbird, L.E., y Gilman, A.G., eds. (2001) The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10^a ed., McGraw-Hill Co.; Colowick, S. et al., eds., Methods in Enzymology, Academic Press, Inc.; Weir, D.M., y Blackwell, C.C. eds. (1986) Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, Blackwell Scientific Publications; Maniatis, T. et al., eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a edición, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al., eds. (1999) Short Protocols in Molecular Biology, 4^a edición, John Wiley & Sons; Ream et al., eds. (1998) Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press; Newton, C.R. y Graham, A., eds. (1997) PCR (Introduction to Biotechniques Series) 2^a ed., Springer-Verlag.

El término "anticuerpo", a menos que se indique otra cosa, se usa para referirse a anticuerpos enteros además de fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos. Por ejemplo, el término abarca moléculas IgG de cuatro cadenas, además de fragmentos de anticuerpo.

Como se usa en la presente memoria, el término "fragmentos de anticuerpo" se refiere a partes de un anticuerpo intacto de longitud completa – tal como una región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (p.ej. scFv); fragmentos de anticuerpo multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, triespecíficos y multiespecíficos (p.ej., diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos); proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión; anticuerpos camélidos; minicuerpos; anticuerpos recombinantes quelantes; tricuerpos o bicuerpos; intracuerpos; nanocuerpos; compuestos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP),

anticuerpos que contienen V_{HH} ; y cualquier otro polipéptido formado a partir de fragmentos de anticuerpo, por ejemplo como se describe adicionalmente a continuación.

Los anticuerpos pueden ser de cualquier clase, tal como IgG, IgA o IgM; y de cualquier subclase, tal como IgG1 o IgG4. Las diferentes clases y subclases de inmunoglobulina tienen diferentes propiedades, que pueden ser ventajosas en diferentes aplicaciones.

La especificidad, en el contexto de la presente invención, necesita que el anticuerpo reivindicado sea capaz de unirse de forma selectiva a su antígeno parecido definido, que es o bien CTLA-4 o el complejo pMHC.

Las inmunoglobulinas que se dan de forma natural tienen una estructura de núcleo común en que dos cadenas ligeras idénticas (aproximadamente 24 kD) y dos cadenas pesadas idénticas (aproximadamente 55 o 70 kD) forman un tetrámero. La parte amino-terminal de cada cadena se conoce como la región variable (V) y puede distinguirse de las regiones constantes (C) más conservadas del resto de cada cadena. En la región variable de la cadena ligera (también denominada el dominio V_L) es una parte C-terminal conocida como la región J. En la región variable de la cadena pesada (también denominada el dominio V_H), hay una región D además de la región J. La mayoría de la variación de la secuencia de aminoácidos en las inmunoglobulinas está confinada a tres posiciones separadas en las regiones V conocidas como regiones hipervariables o regiones que determinan la complementariedad (CDRs) que están implicadas directamente en la unión al antígeno. Empezando desde el extremo amino, estas regiones se designan CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. Las CDRs se mantienen en el sitio mediante regiones de la estructura más conservadas (FRs). Empezando desde el extremo amino, estas regiones se designan FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente. Las posiciones de las regiones CDR y FR y un sistema de numeración se han definido por Kabat et al. (Kabat, E.A., et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta edición, Departamento de salud y servicios humanos de EE.UU., Oficina de impresión del gobierno de EE.UU.) y las actualizaciones de los mismos que pueden encontrarse en internet.

Un anticuerpo monoclonal humanizado, como se denomina en la presente memoria, es un anticuerpo que está compuesto por una estructura de anticuerpo humano, en que se han injertado las CDRs de un anticuerpo no humano. Los procedimientos para el diseño y producción de anticuerpos humanizados se conocen bien en la técnica, y se han descrito, por ejemplo, en Cabilly et al., Patente de EE.UU. núm. 4.816.567; Cabilly et al., Solicitud de Patente Europea 0 125 023; Boss et al., Patente de EE.UU. núm. 4.816.397; Boss et al., Solicitud de Patente Europea 0 120 694; Neuberger, M.S. et al., documento WO 86/01533; Neuberger, M.S. et al., Solicitud de Patente Europea 0 194 276 B1; Winter, Patente de EE.UU. núm. 5.225.539; Winter, Solicitud de Patente Europea 0 239 400; Padlan, E.A. et al., Solicitud de Patente Europea 0 519 596. Más detalles en anticuerpos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos desarrollados por ingeniería, y métodos para su preparación pueden encontrarse en Kontermann, R. y Dübel, S. Eds. (2001, 2010) *Antibody Engineering*, 2ª ed., Springer-Verlag, Nueva York, NY, 2001.

Las regiones constantes pueden derivarse de cualquier región constante de anticuerpo humano. Típicamente, los genes de región variable se clonan en vectores de expresión en conjunto con genes de región constante para expresar las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera. Dichos vectores de expresión pueden transfectarse en células huésped que producen anticuerpos para la síntesis de anticuerpos.

Las regiones variables y constantes del anticuerpo necesarias pueden derivarse de bases de datos de secuencias. Por ejemplo, las secuencias de inmunoglobulina están disponibles en la base de datos IMGT/LIGM (Giudicelli et al., (2006) *Nucleic Acids Res.* 34:(supl. 1):D781-D784) o VBase (vbase.mrcce.cam.ac.uk).

“Ácidos nucleicos” como se indican en la presente memoria incluyen típicamente moléculas de ADN que codifican los anticuerpos de la invención. Se prefieren los vectores de expresión, que son adecuados para expresar los genes de anticuerpo en una célula huésped. Los vectores de expresión y células huésped para la expresión de genes de anticuerpo se conocen en la técnica; véase, por ejemplo, Morrow, K.J. (2008) *Genetic Engineering & Biotechnology News* (15 de junio de 2008) 28(12), y Backliwal, G., et al. (2008) *Nucleic Acids Res.* 36(15):e96-e96.

“CD80”, como se usa en la presente memoria, se refiere al antígeno CD80 de mamífero además de a mutantes del mismo que han aumentado la avidéz de unión o la especificidad por CTLA-4. Véase Linsley et al., (1994) *Immunity* 1:793-801, y Wu et al., (1997) *J. Exp. Med.* 185(7):1327-1335. El CD80 de mamífero puede seleccionarse de CD80 de roedor, tal como ratón, o humano.

“CD86”, como se usa en la presente memoria, se refiere al antígeno CD86 de mamífero además de a mutantes del mismo que han aumentado la avidéz de unión o especificidad por CTLA-4. Véase Linsley et al., (1994) *Immunity* 1:793-801. El CD86 de mamífero puede seleccionarse de CD86 de roedor, tal como ratón, o humano.

“CTLA-4”, como se usa en la presente memoria, se refiere al antígeno-4 asociado a linfocito citotóxico (CTLA-4) de mamífero. La secuencia de CTLA-4 humano puede encontrarse en GenBank, número de acceso AAH74893.1, GI:49904741. El CTLA-4 de mamífero puede seleccionarse de CTLA-4 de roedor, tal como ratón, o humano.

“LAG-3”, como se usa en la presente memoria, se refiere al antígeno 3 de activación de linfocitos (LAG-3) de mamífero. La secuencia para LAG-3 humano puede encontrarse en Huard et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:5744-5749. El LAG-3 de mamífero puede seleccionarse de LAG-3 de roedor, tal como ratón, o humano.

El "MHC" es el complejo implicado en la presentación de péptidos derivados de antígeno mediante células que presentan el antígeno, que se reconoce por el TCR. En un cierto aspecto, el MHC es MHCII, que presenta el antígeno a las células T colaboradoras CD4⁺. Véase, por ejemplo, Wucherpfennig et al., *CSH Perspect. Biol.* 2(4):a005140, epub 17 de marzo de 2010.

5 Un compuesto biológico biespecífico, que puede considerarse como un ligando biespecífico, es un ligando que es capaz de unirse, o estar unido por, dos dianas contemporáneamente. Los anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica, y se describen adicionalmente a continuación. En el contexto de la presente descripción, incluyendo la presente invención, las dos dianas son la molécula CTLA-4 en una célula T y el complejo de MHC péptido en una APC. El compuesto biológico biespecífico según la descripción puede reticular las dos dianas; por medio de la unión de pMHC al TCR en la sinapsis inmune, reticula por lo tanto la molécula CTLA-4 al TCR. Un "compuesto biológico", en general, es un compuesto terapéutico o agente biológico, que puede ser útil para, entre otros, propósitos terapéuticos, diagnósticos y/o de investigación.

15 Un conector es cualquier secuencia de aminoácidos que une y separa dos dominios de polipéptido en una proteína. En el contexto del ligando biespecífico de la invención, el conector es la secuencia que une el ligando CTLA-4 al ligando MHC. Conectores ejemplares son secuencias de aminoácidos, tal como poliglicina, por ejemplo, Gly-9. Un conector alternativo es una región Fc de anticuerpo. Dicho conector separa los dos dominios de ligando en aproximadamente 120 Å.

20 Un ligando según la invención puede comprender ligandos anticuerpo y no anticuerpo en cualquier combinación. Por ejemplo, el ligando de CTLA-4 puede ser un anticuerpo anti-CTLA-4, y el ligando de MHC puede ser LAG-3. De forma alternativa, puede usarse CD80 como el ligando de CTLA-4, en combinación con LAG-3 o un anticuerpo anti-MHC. Ambos ligandos pueden ser anticuerpos, o ambos pueden ser los ligandos naturales, CD80 y LAG-3.

Antígeno-4 asociado con linfocito citotóxico (CTLA-4)

25 El antígeno-4 asociado con linfocito T citotóxico (CTLA-4), también conocido como CD152, es un regulador negativo de la respuesta de células T, que juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de células T y en la inducción de auto-tolerancia (Karandikar et al., (1996) *J Exp Med* 184:783-788; Krummel y Allison, (1995) *J Exp Med* 182:459-465; Linsley y Golstein, (1996) *Curr Biol* 6:398-400; Walunas y Bluestone, (1998) *J Immunol* 160:3855-3860; Walunas et al., (1994) *J Immunol* 160:3855-3860). Los ratones deficientes en CTLA-4 desarrollan enfermedad autoinmune multi-orgánica y típicamente sucumben a la enfermedad a las 4 semanas de edad (Tivol et al., (1995) *Immunity* 3:541-547; Waterhouse et al., (1995) *Science* 270:985-988). Los mecanismos moleculares a través de los que CTLA-4 modula la actividad de células T son multifacéticos y se piensa que se dan o bien de forma intrínseca en células T convencionales o de forma extrínseca a través de células T reguladoras (Tregs) (Ise et al., (2010) *Nat Immunol* 11:129-135; Jain et al., (2010) *Proc Natl Acad Sci USA* 107:1524-1528; Paterson y Sharpe, (2010) *Nat Immunol* 11:109-111).

35 Estos mecanismos incluyen competir con CD28 por la unión al ligando (Linsley et al., (1994) *Immunity* 1:793-801), inducir la producción de la enzima tolerogénica indolamina 2,3 dioxigenasa en la APC (Grohmann et al., (2002) *Nat Immunol* 3:1097-1101; Onodera et al., (2009) *J Immunol* 183:5608-5614), y desplazar al CD28 de la sinapsis inmunológica (Pentcheva-Hoang et al., (2004) *Immunity* 21:401-413). El CTLA-4 es homólogo de la molécula co-estimuladora CD28 y comparte los mismos ligandos, CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), que se expresan en la superficie de las células que presentan antígenos (APCs). Sin embargo, la unión diferencial de CD80/CD86 en las APCs a CD28 y CTLA-4 en las células T efectoras lleva a resultados contrarios, desencadenando CD28 la activación de células T y provocando CTLA-4 la inhibición de células T. La unión de CTLA-4 mediante sus ligandos (CD80/86) en la APC también estimula el reclutamiento de las fosfatasa SHP-1 (Guntermann y Alexander, (2002) *J Immunol* 168:4420-4429) y PP2A (Baroja et al., (2002) *J Immunol* 168:5070-5078; Chuang et al., (2000) *Immunity* 13:313-322) a la vecindad del TCR de las células T que experimentan activación. La consiguiente desfosforilación de las moléculas de señalización claves asociadas con el TCR da por resultado la terminación de la activación de células T (Griffin et al., (2000) *J Immunol* 164:4433-4442). Además, las intervenciones que promueven la unión temprana de CTLA-4 con sus ligandos y el reticulado al TCR dan por resultado la disminución prematura de las marcas de señalización clave y la consiguiente inhibición de la activación de células T, llevando a la menor respuesta o anergia de células T (Blair et al., (1998) *Immunol* 160:12-15; Griffin et al., (2000) *J Immunol* 164:4433-4442; Krummel y Allison, (1996) *J Exp Med* 182:459-465; Walunas et al., (1996) *J Exp Med* 183:2541-2550).

Al promover el reticulado de CTLA-4 al TCR durante la fase temprana de la activación de células T se generó una proteína de fusión biespecífica (designada como "BsB") que comprende un CD80 mutante (CD80w88a) y el gen-3 de activación de linfocitos (LAG-3). BsB se diseñó para unir simultáneamente CTLA-4 y MHCII en la sinapsis inmune y así reticularlo indirectamente al TCR por medio del emparejamiento similar de MHCII con el TCR (Karman et al., (2012) *J Biol Chem* epub 15 de febrero de 2012). En una MLR alogénica, se mostró que BsB era efectivo inhibiendo la activación de células T. Sorprendentemente, BsB también indujo la producción de IL-10 y TGF-β y promovió la diferenciación de células T que experimentan la activación a Tregs. IL-10 puede ejercer amplias propiedades supresoras inmunes a través de su capacidad para controlar la activación de macrófagos y células dendríticas (DCs), además de auto-regular las células Th1 (Ohata et al., (2007) *Arthritis Rheum* 56:2947-2956). TGF-β puede actuar como un inhibidor de diferenciación de células T (Kehrl et al., (1986) *J Exp Med* 163:1037-1050), activación

de macrófagos (Tsunawaki et al., (1988) *Nature* 334:260-262; Wahl et al., (1990) *Ann N Y Acad Sci* 593:188-196) y maduración de células dendríticas (Steinman et al., (2003) *Annu Rev Immunol* 21:685-711). Además de sus funciones anti-inflamatorias, IL-10 y TGF- β supuestamente pueden también influir en la función de Treg. Por ejemplo, se ha mostrado que IL-10 induce células Tr1 que producen IL-10 (Roncarolo et al., (2006) *Immunol Rev* 212:28-50) y actúan en las Tregs Foxp3⁺ para mantener la expresión de Foxp3 y propagar así su función supresora (Murai et al., (2009) *Nat Immunol* 10:1178-1184). De forma similar, se ha presentado que TGF- β es necesario para la inducción de Tregs (Chen et al., (2003) *J Exp Med* 198:1875-1886; Zheng et al., (2002) *J Immunol* 169:4183-4189) y en el mantenimiento de su función supresora promoviendo la expresión de Foxp3 (Marie et al., (2005) *J Exp Med* 201:1061-1067).

10 Células T reguladoras (Tregs)

Las Tregs son una subpoblación funcionalmente distinta de células T capaces de controlar las respuestas inmunes a antígenos propios y no propios. Una deficiencia de Tregs da por resultado una respuesta inmune intensificada y la presentación de enfermedades autoinmunes (Sakaguchi et al., (1995) *J Immunol* 155:1151-1164). La investigación exhaustiva ha establecido un papel de estas células T especializadas en el control de todos los aspectos de las respuestas inmunes, en particular en la generación de auto-tolerancia. Sin estar atados a una teoría particular, estos descubrimientos indican que los agentes capaces de estimular la producción in situ de Tregs o la transferencia adoptiva de Tregs pueden utilizarse para tratar enfermedades autoinmunes. De hecho, se ha mostrado que las terapias basadas en células Treg que usan Tregs recién aisladas o expandidas ex vivo son efectivas en el tratamiento de modelos animales de diabetes tipo 1 (DT1) (Tang et al., (2004) *J Exp Med* 199:1455-1465; Tarbell et al., (2007) *J Exp Med* 204:191-201) y enfermedad de injerto frente a huésped (Anderson et al., (2004); Taylor et al., (2002) *Blood* 99:3493-3499; Zhao et al., (2008) *Blood* 112:2129-2138). En vez de aislar y expandir las Tregs Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ (a menudo designadas como Tregs naturales o nTregs) de la sangre periférica o nódulos linfáticos, las Tregs pueden inducirse a partir de células T CD4⁺CD25⁻ no tratadas anteriormente en el contexto de la activación de TCR y en la presencia simultánea de TGF- β .

Se hace referencia a menudo a estas Tregs como Tregs adaptables (aTregs) o Tregs inducidas (iTregs). Son también Foxp3⁺ y supuestamente muestran funciones supresoras igual de potentes que las nTregs (Chen et al., (2003) *J Exp Med* 198:1875-1886; Yamagiwa et al., (2001) *J Immunol* 166:7282-7289; Zheng et al., (2002) *J Immunol* 169:4183-4189). Se ha mostrado que las transferencias adoptivas de aTregs o iTregs son efectivas en dar protección frente a la enfermedad autoinmune en un modelo animal de artritis inducida por colágeno (González-Rey et al., (2006) *Arthritis Rheum* 54:864-876). Sin embargo, se está haciendo más evidente que las Tregs específicas de antígeno ofrecen un cociente terapéutico significativamente mayor que las Tregs policlonales con un repertorio pan-TCR (Masteller et al., (2005) *J Immunol* 175:3053-3059; Tang et al., (2004) *J Exp Med* 199:1455-1465; Tarbell et al., (2007) *J Exp Med* 204:191-201), con menos efectos secundarios potenciales en la supresión paninmune. Por esta razón, se buscó evaluar los méritos relativos de BsB en la producción de Tregs específicas de antígeno en un escenario de activación de células T específicas de antígeno *in vitro*. Además, se probó su potencial en el tratamiento de diabetes autoinmune en el ratón diabético no obeso (NOD).

Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune provocada por la destrucción específica de tejido de células β pancreáticas que producen insulina con el posterior desarrollo de hiperglucemia. Los ratones diabéticos no obesos (NOD) (ratones hembra en particular) desarrollan de forma espontánea células T autorreactivas hacia los autoantígenos específicos de islotes (p.ej. insulina y ácido glutámico descarboxilasa 65). En sintonía con otros linfocitos, estas células T autorreactivas inician el desarrollo de peri-insulitis entre 3 y 4 semanas de edad seguido por insulitis invasiva a las 9 semanas y diabetes manifiesta espontánea entre las 12 y 35 semanas (Anderson y Bluestone, (2005) *Annu Rev Immunol* 23:447-485). Los ratones NOD comparten muchas similitudes con la enfermedad en humanos tal como la producción de autoanticuerpos específicos del páncreas y la activación de células T CD4⁺ y CD8⁺ autorreactivas. La susceptibilidad de estos ratones a la autoinmunidad, como en los seres humanos, está influida por los genes para el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), CTLA-4 y LAG-3. Los ratones NOD albergan un haplotipo (H-2^{g7}) del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) único, que otorga supuestamente el mayor riesgo para la susceptibilidad a la enfermedad (McDevitt et al., (1996) *Hormone and metabolic research* 28:287-288; Wicker et al., (1995) *Annu Rev Immunol* 13:179-200). El polimorfismo de CTLA-4 también se ha notado en los ratones NOD (Ueda et al., (2003) *Nature* 423:506-511) y en humanos (Qu et al., (2009) *Genes and immunity* 10 Supl. 1:S27-32) y una deficiencia de LAG-3 en el historial NOD acelera el comienzo de DT1 con 100% de penetración (Bettini et al., (2011) *J Immunol* 187:3493-3498). Porque BsB se une a todas estas dianas, los méritos terapéuticos de BsB se probaron en este modelo murino de DT1.

55 Anticuerpos

La invención abarca fragmentos de unión al antígeno de los anticuerpos descritos en las reivindicaciones. Como se usa en la presente memoria, el término "fragmentos" se refiere a partes del anticuerpo intacto de longitud completa – tal como una región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo se describen anteriormente.

El término “fragmentos” como se usa en la presente memoria se refiere a fragmentos capaces de unir las dianas especificadas, la molécula CTLA-4 o el complejo pMHC. Estos fragmentos pueden carecer del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, retirarse más rápidamente de la circulación, y pueden tener menos unión al tejido no específico que un anticuerpo intacto. Estos fragmentos pueden producirse a partir de anticuerpos intactos usando métodos bien conocidos, por ejemplo mediante escisión proteolítica con enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂), o la expresión de dichos fragmentos por tecnología recombinante.

Los anticuerpos y fragmentos también abarcan fragmentos de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) que se unen a la molécula CTLA-4 o el complejo pMHC. Un scFv comprende una región variable de la cadena pesada del anticuerpo (V_H) unida de forma operable a una región variable de la cadena ligera del anticuerpo (V_L) en donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, juntas o de forma individual, forman un sitio de unión que se une a la molécula CTLA-4 o al complejo pMHC. Un scFv puede comprender una región V_H en el extremo amino-terminal y una región V_L en el extremo carboxi-terminal. De forma alternativa, scFv puede comprender una región V_L en el extremo amino-terminal y una región V_H en el extremo carboxi-terminal. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que los permite estar integrados como una cadena de proteína sencilla en que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv)). Un scFv puede opcionalmente comprender además un conector polipeptídico entre la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera.

Los anticuerpos y fragmentos también abarcan fragmentos de dominios de anticuerpo (dAb) como se describen en Ward, E.S. et al. (1989) *Nature* 341:544-546 que consisten en un dominio V_H.

Los anticuerpos y fragmentos también abarcan anticuerpos de cadena pesada (HCAb). Estos anticuerpos pueden formar aparentemente regiones de unión al antígeno usando solo la región variable de la cadena pesada, en ellas estos anticuerpos funcionales son dímeros solo de cadenas pesadas (denominadas como “anticuerpos de cadena pesada” o “HCAbs”). Por consiguiente, los anticuerpos y fragmentos pueden ser anticuerpos de cadena pesada (HCAb) que se unen específicamente a las dianas CTLA-4 o pMHC.

Los anticuerpos y fragmentos también abarcan a los anticuerpos que son SMIPs o proteínas de fusión de dominio de unión de inmunoglobulina específicas para las dianas CTLA-4 o pMHC. Estos constructos son polipéptidos de cadena sencilla que comprenden dominios de unión al antígeno condensados con dominios de inmunoglobulina necesarios para llevar a cabo las funciones efectoras del anticuerpo (véase el documento WO 2005/017148).

Los anticuerpos y fragmentos también abarcan diacuerpos. Estos son anticuerpos bivalentes en que los dominios V_H y V_L se expresan en una única cadena polipeptídica, aunque usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Esto fuerza al dominio a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y por lo tanto crea dos sitios de unión al antígeno (véase, por ejemplo, el documento WO 93/11161). Los diacuerpos pueden ser biespecíficos o mono-específicos.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo según la invención no presenta reacción cruzada con ninguna diana distinta de las dianas CTLA-4 o pMHC previstas.

Los anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden ser ellos mismos biespecíficos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden parecerse a anticuerpos sencillos (o fragmentos de anticuerpo) pero tienen dos diferentes sitios de unión al antígeno (regiones variables). Los anticuerpos biespecíficos pueden producirse por diversos métodos – tales como técnicas químicas, técnicas de “polidoma” o técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos biespecíficos pueden tener especificidades de unión para al menos dos epítomos diferentes, por ejemplo un epítomo en cada una de las dianas CTLA-4 y pMHC.

Los anticuerpos biespecíficos que comprenden pares complementarios de regiones V_H y V_L se conocen en la técnica. Estos anticuerpos biespecíficos comprenden dos pares de V_H y V_L, cada par V_HV_L uniéndose a un único antígeno o epítomo. Dichos anticuerpos biespecíficos incluyen hibridomas híbridos (Milstein, C. y Cuello, A.C., (1983) *Nature* 305 (5934):537-40), minicuerpos (Hu et al., (1996) *Cancer Res.* 56:3055-3061), diacuerpos (Holliger et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; documento WO 94/13804), anticuerpos recombinantes quelantes (CRABs) (Neri et al., (1995) *J. Mol. Biol.* 246, 367-373), bscFv (p.ej. Atwell et al., (1996) *Mol. Immunol.* 33:1301-1312), anticuerpos estabilizados “botón en ojal” (Carter et al., (1997) *Protein Sci.* 6:781-788). En cada caso cada especie de anticuerpo comprende dos sitios de unión al antígeno, cada uno formado por un par complementario de dominios V_H y V_L. Cada anticuerpo es capaz por lo tanto de unirse a dos antígenos o epítomos diferentes al mismo tiempo, con la unión a cada antígeno o epítomo mediada por un V_H y su dominio V_L complementario.

Se ha descrito que los autoanticuerpos naturales son poli-reactivos (Casali y Notkins (1989) *Ann. Rev. Immunol.* 7:515-531), que reaccionan con al menos dos (normalmente más) antígenos o epítomos diferentes que no están relacionados estructuralmente. También se ha mostrado que las selecciones de repertorios peptídicos aleatorios que usan la tecnología de visualización de fagos en un anticuerpo monoclonal identificarán un intervalo de secuencias peptídicas que se ajustan al sitio de unión al antígeno. Algunas de las secuencias están altamente relacionadas, adaptando una secuencia de consenso, mientras otras son muy diferentes y se han denominado mimotopos (Lane y

Stephen (1993) *Current Opinion in Immunology* 5:268-271). Está claro por lo tanto que el sitio de unión de un anticuerpo, que comprende dominios V_H y V_L asociados y complementarios, tiene el potencial de unirse a muchos antígenos diferentes de un gran universo de antígenos conocidos.

5 El documento WO 03/002609 (Domantis) describe la producción de anticuerpos específicos duales en que cada para $V_H V_L$ posee una especificidad dual, es decir, es capaz de unir dos epítomos en los mismos o diferentes antígenos. La conformación puede ser abierta o cerrada; en una conformación abierta, los dos epítomos pueden unirse de forma simultánea, pero en la conformación cerrada la unión al primer epítomo evita o disuade la unión al segundo.

10 Las proteínas que no son inmunoglobulina con múltiples especificidades de unión se conocen en la naturaleza; por ejemplo, un número de factores de transcripción se unen tanto al ADN como a otras moléculas de proteína. Sin embargo, los métodos para seleccionar péptidos de unión en la técnica anterior solo seleccionan péptidos con especificidades sencillas, no duales o múltiples.

15 Diferentes equipos de investigación han conectado anteriormente polipéptidos con residuos de cisteína a una estructura molecular sintética (Kemp, D.S. y McNamara, P.E., (1985) *J. Org. Chem.* Timmerman, P. et al., (2005) *ChemBioChem*. 6(5):821-4). Meloen y colaboradores habían usado tris(bromometil)benzeno y moléculas relacionadas para la ciclación rápida y cuantitativa de bucles peptídicos múltiples en andamiajes sintéticos para el mimetismo estructural de superficies de proteína (Timmerman, P. et al., (2005) *ibid*). Los métodos para la generación de fármacos candidatos en donde dichos compuestos se generan uniendo polipéptidos que contienen cisteína a un andamiaje molecular como por ejemplo tris(bromometil)benzeno se describen en los documentos WO 2004/077062 y WO 2006/078161. La selección de dichas moléculas usando la tecnología de visualización se describe en el documento WO 2009/098450. Las realizaciones específicas duales se describen además en el documento WO 2010/089117.

25 El ligando, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo, puede modificarse para aumentar su vida media en suero, por ejemplo, añadiendo moléculas – tales como PEG u otros polímeros solubles en agua, incluyendo polímeros de polisacárido para aumentar la vida media. En una realización, una región Fc de anticuerpo puede añadirse al conector biespecífico según la invención, para aumentar la vida media circulante.

Producción de anticuerpos

30 La producción de anticuerpos puede realizarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica, incluyendo en organismos transgénicos tales como cabras (véase Pollock et al. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147-157), pollos (véase Morrow, KJJ (2000) *Genet. Eng. News* 20:1-55), ratones (véase Pollock et al. *ibid*) o plantas (véase Doran PM (2000) *Curr. Opinion Biotechnol.* 11:199-204; Ma, JK-C (1998) *Nat. Med.* 4:601-606; Baez, J. et al. (2000) *BioPharm.* 13:50-54; Stoger, E. et al. (2000) *Plant Mol. Biol.* 42:583-590). Los anticuerpos pueden producirse también mediante síntesis química; sin embargo se prefiere la expresión de genes que codifican los anticuerpos en células huésped.

35 Un polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en un constructo o vector replicable tal como un plásmido por la propagación adicional o expresión en una célula huésped. Los constructos o vectores (p.ej. vectores de expresión) adecuados para la expresión de una inmunoglobulina humanizada según la invención están disponibles en la técnica. Una variedad de vectores están disponibles, incluyendo vectores que se mantienen en copia sencilla o múltiples copias en una célula huésped, o que se integran en el(los) cromosoma(s) de la célula huésped. Los constructos o vectores pueden introducirse en una célula huésped adecuada, y las células que expresan una inmunoglobulina humanizada pueden producirse y mantenerse en cultivo. Un único vector o vectores múltiples pueden usarse para la expresión de una inmunoglobulina humanizada.

45 Los polinucleótidos que codifican el anticuerpo se aíslan fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, sondas de oligonucleótido). Los vectores que pueden usarse incluyen plásmidos, virus, fagos, transposones, minicromosomas de los que los plásmidos son una realización típica. Generalmente dichos vectores incluyen además una secuencia señal, origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y secuencias de terminación de la transcripción unidas de forma operable al polinucleótido de cadena ligera y/o pesada para así facilitar la expresión. Los polinucleótidos que codifican las cadenas ligera y pesada pueden insertarse en vectores separados e introducirse (p.ej. mediante transformación, transfección, electroporación o transducción) en la misma célula huésped simultáneamente o secuencialmente o, si se desea tanto la cadena pesada como la cadena ligera pueden insertarse en el mismo vector antes de dicha introducción.

50 Puede proporcionarse un promotor para la expresión en una célula huésped adecuada. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, un promotor puede unirse de forma operable a un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina humanizada, de manera que dirige la expresión del polipéptido codificado. Una variedad de promotores adecuados para huéspedes procariontes y eucariotes está disponible. Los promotores procariontes incluyen promotores lac, tac, T3, T7 para *E. coli*; 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas p.ej., enolasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa y glucoquinasa. Los promotores eucariotes

incluyen promotores de levadura inducibles tales como alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneina y enzimas responsables para el metabolismo de nitrógeno o utilización de maltosa/galactosa; promotores de ARN polimerasa II que incluyen promotores víricos tales como polioma, viruela aviar y adenovirus (p.ej., adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular el promotor del gen temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus del sarcoma de rous (VSR) y el virus 40 de los simios temprano o tardío y promotores no virales tal como EF-1 alfa (Mizushima y Nagata (1990) *Nucleic Acids Res.* 18(17):5322). Los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar el promotor apropiado para expresar un anticuerpo humanizado o parte del mismo de la invención.

Donde sea apropiado, p.ej. para la expresión en células de eucariotas superiores, pueden incluirse elementos potenciadores adicionales en vez de o además de los encontrados situados en los promotores descritos anteriormente. Secuencias potenciadoras para mamíferos adecuadas incluyen elementos potenciadores procedentes de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína, metalotionina e insulina. De forma alternativa, se puede usar un elemento potenciador procedente de un virus de célula eucariota tal como potenciador SV40, potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, potenciador de polioma, potenciador baculovírico o posición IgG2a murina (véase el documento WO 04/009823). Aunque dichos potenciadores están situados típicamente en el vector en un sitio corriente arriba del promotor, también pueden situarse en otro sitio p.ej., en la región no traducida o corriente abajo de la señal de poliadenilación. La elección y posición del potenciador puede basarse en la compatibilidad con la célula huésped usada para la expresión.

Además, los vectores (p.ej., vectores de expresión) típicamente comprenden un marcador seleccionable para la selección de células huésped que portan el vector y, en el caso de un vector replicable, un origen de replicación. Los genes que codifican productos que confieren resistencia a antibióticos o fármacos son marcadores seleccionables comunes y pueden usarse en células procariontas (p.ej., gen de β -lactamasa (resistencia a la ampicilina), gen Tet (resistencia a la tetraciclina) y eucariotas (p.ej., genes de resistencia a la neomicina (G418 o genética), gpt (ácido micofenólico), ampicilina o higromicina). Los genes marcadores de dihidrofolato reductasa permiten la selección con metotrexato en una variedad de huéspedes. Los genes que codifican el producto génico de marcadores auxotróficos del huésped (p.ej. *LEU2*, *URA3*, *HIS3*) se usan a menudo como marcadores seleccionables en la levadura. El uso de vectores víricos (p.ej. baculovirus) o de fagos, y los vectores que son capaces de integrarse en el genoma de la célula huésped, tal como vectores retrovirales, también se contemplan.

En los sistemas eucariotas, las señales de poliadenilación y terminación se unen de forma operable al polinucleótido que codifica el anticuerpo de esta invención. Dichas señales se sitúan típicamente en 3' del marco de lectura abierta. En los sistemas de mamíferos, los ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen las derivadas de hormonas de crecimiento, factor-1 alfa de alargamiento y genes víricos (p.ej. SV40) o repeticiones terminales largas retrovirales. En los sistemas de levadura, los ejemplos no limitantes de señales de poliadenilación/terminación incluyen las derivadas de los genes de fosfoglicerato quinasa (PGK) y alcohol deshidrogenasa 1 (ADH). En los sistemas procariontas las señales de poliadenilación no se necesitan típicamente y en vez de eso es normal emplear secuencias terminadoras más cortas y más definidas. La elección de secuencias de poliadenilación/terminación puede basarse en la compatibilidad con la célula huésped usada para la expresión. Además de lo anterior, otras características que pueden emplearse para potenciar los rendimientos incluyen elementos de remodelación de cromatina, intrones y modificación del codón específico de la célula huésped. El uso del codón del anticuerpo de esta invención del mismo puede modificarse para acomodar la preferencia codónica de la célula huésped dicha para aumentar el rendimiento del transcrito y/o producto (p.ej., Hoekema, A. et al. (1987) *Mol Cell Biol.* 7(8):2914-24). La elección de codones puede basarse en la compatibilidad con la célula huésped usada para la expresión.

La invención se refiere por consiguiente a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican inmunoglobulinas humanizadas, o cadenas pesadas o ligeras de las mismas, de esta invención. La invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una parte de unión al antígeno de las inmunoglobulinas y sus cadenas.

Los anticuerpos según esta invención pueden producirse, por ejemplo, mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican el anticuerpo en una célula huésped adecuada. La célula huésped puede producirse usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, los constructos de expresión (p.ej., uno o más vectores, p.ej., un vector de expresión de células de mamífero) descritos en la presente memoria pueden introducirse en una célula huésped adecuada, y la célula resultante puede mantenerse (p.ej., en cultivo, en un animal, en una planta) bajo condiciones adecuadas para la expresión del(de los) constructo(s) o vector(es). Las células huésped adecuadas pueden ser procariontas, incluyendo células bacterianas tales como *E. coli* (p.ej., cepa DH5aTM (Invitrogen, Carlsbad, CA), células PerC6 (Crucell, Leiden, NL), *B. subtilis* y/u otras bacterias adecuadas; células eucariotas, tales como células fúngicas o de levadura (p.ej. *Pichia pastoris*, *Aspergillus sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*), u otras células eucariotas inferiores, y células de eucariotas superiores tales como las procedentes de insectos (p.ej. células de *Drosophila* Schnieder S2, células de insecto Sf9 (documento WO 94/126087 (O'Connor), células de insecto TN5BI-4 (HIGH FIVETM) (Invitrogen), mamíferos (p.ej. células COS, tal como COS-1 (núm. de acceso ATCC CRL-1650) y COS-7 (núm. de acceso ATCC CRL-1651), CHO (p.ej. núm. de acceso ATCC CRL-9096), CHO DG44 (Urlaub, G. y Chasin, LA. (1980) *Proc. Natl.*

Acac. Sci. USA, 77(7):4126-4220), 293 (número de acceso ATCC CRL-1573) HeLa (número de acceso ATCC CCL-2), CVI (número de acceso ATCC CCL-70), WOP (Dailey, L., et al., (1985) *J. Virol.*, 54:739-749), 3T3, 293T, (Pear, W.S., et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:8392-8396), células NSO, células SP2/0, células HuT 78 y similares, o plantas (p.ej., tabaco, lemná (lenteja de agua), y algas). Véase, por ejemplo, Ausubel, F.M., et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons Inc. (1993). En algunas realizaciones, la célula huésped no es parte de un organismo multicelular (p.ej. planta o animal), p.ej., es una célula huésped aislada o es parte de un cultivo celular.

Las células huésped pueden cultivarse en matraces de agitación, matraces oscilantes, botellas de cultivo rotatorias, biorreactores wave (p.ej. System 1000 de wavebiotech.com) o sistemas de fibra hueca pero se prefiere para la producción a gran escala que los biorreactores de tanque agitado o biorreactores de bolsa (p.ej. Wave Biotech, Somerset, Nueva Jersey EE.UU.) se usen particularmente para cultivos en suspensión. Los biorreactores de tanque agitado típicamente se adaptan para la aireación usando p.ej., burbujeadores, deflectores o impulsores de baja cizalladura. Para las columnas de burbujeo y biorreactores de levantamiento por aire, puede usarse la aireación directa con burbujas de aire u oxígeno. Donde las células huésped se cultivan en un medio de cultivo libre de suero, el medio puede suplementarse con un agente protector celular tal como pluronic F-68 para ayudar a evitar el daño celular como resultado del proceso de aireación. Dependiendo de las características de la célula huésped, pueden usarse microtransportes como sustratos de crecimiento para las líneas celulares dependientes del anclaje, o las células pueden adaptarse al cultivo en suspensión. El cultivo de células huésped, particularmente células huésped de vertebrado, puede utilizar una variedad de modos de operación tales como procesado por lotes, lotes alimentados, lotes repetidos (véase Drapeau et al (1994) *Cytotechnology* 15:103-109), proceso por lotes extendidos o cultivo por perfusión. Aunque las células huésped de mamíferos transformadas de forma recombinante pueden cultivarse en medios que contienen suero tal como medios que comprenden suero fetal bovino (FCS), se prefiere que dichas células huésped se cultiven en medios libres de suero tal como se describe en Keen et al (1995) *Cytotechnology* 17:153-163, o medios comercialmente disponibles tales como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex, NJ, EE.UU.), suplementados donde sea necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina recombinante. Los cultivos libres de suero de las células huésped pueden necesitar que esas células se adapten al crecimiento en condiciones libres de suero. Una estrategia de adaptación es cultivar dichas células huésped en medios que contienen suero e intercambiar de forma repetida el 80% del medio de cultivo por los medios libres de suero de manera que las células huésped aprendan a adaptarse en condiciones libres de suero (véase, p.ej., Scharfenberg K et al (1995) en *Animal Cell Technology Developments Towards the 21st Century* (Beuvery E.C. et al eds), págs. 619-623, Kluwer Academic publishers).

Los anticuerpos según la invención pueden secretarse en el medio y recuperarse y purificarse a partir del mismo usando una variedad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso previsto. Por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos de la invención para el tratamiento de pacientes humanos exige típicamente al menos el 95% de pureza como se determina reduciendo SDS-PAGE, más típicamente 98% o 99% de pureza, cuando se compara con los medios de cultivo que comprenden los anticuerpos terapéuticos. En un primer ejemplo, los restos celulares de los medios de cultivo se eliminan típicamente usando la centrifugación seguida por una etapa de clarificación del sobrenadante usando p.ej., microfiltración, ultrafiltración y/o filtración profunda. De forma alternativa, el anticuerpo puede cosecharse por microfiltración, ultrafiltración o filtración profunda sin centrifugación previa. Una variedad de otras técnicas tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como cromatografía por hidroxipatita (HA), de afinidad (que implica opcionalmente un sistema de etiquetado por afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (véase el documento US 5.429.746) están disponibles. En una realización, los anticuerpos de la invención, después de varias etapas de clarificación, se capturan usando cromatografía de afinidad de proteína A o G seguido por etapas de cromatografía adicionales tales como cromatografía de intercambio iónico y/o HA, intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de exclusión por tamaño y precipitación en sulfato de amonio. Típicamente, también se emplean varias etapas de eliminación de virus (p.ej., nanofiltración que usa, p.ej., un filtro DV-20). Después de estas diversas etapas, se proporciona un preparado purificado que comprende al menos 10 mg/ml o más p.ej., 100 mg/ml o más del anticuerpo de la invención y por lo tanto forma una realización de la invención. Puede generarse una concentración a 100 mg/ml o más por ultracentrifugación. Dichos preparados están esencialmente libres de formas agregadas de anticuerpos de la invención.

Los sistemas bacterianos son particularmente adecuados para la expresión de fragmentos de anticuerpo. Dichos fragmentos se localizan intracelularmente o en el periplasma. Las proteínas periplasmáticas insolubles pueden extraerse y replegarse para formar proteínas activas según los métodos conocidos por los expertos en la técnica, véase Sánchez et al. (1999) *J. Biotechnol.* 72:13-20; Cupit, PM et al. (1999) *Letf. Appl. Microbiol.* 29:273-277.

La presente invención también se refiere a células que comprenden un ácido nucleico, p.ej., un vector, de la descripción (p.ej., un vector de expresión). Por ejemplo, un ácido nucleico (es decir, uno o más ácidos nucleicos) que codifica las cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina humanizada según la descripción, o un constructo (es decir, uno o más constructos, p.ej. uno o más vectores) que comprende dicho(s) ácido(s) nucleico(s), puede introducirse en una célula huésped adecuada por un método apropiado a la célula huésped seleccionada (p.ej., transformación, transfección, electroporación, infección), con el(los) ácido(s) nucleico(s) estando unidos, o uniéndose, de forma operable a uno o más elementos de control de expresión (p.ej., en un vector, en un constructo

creado por procesos en la célula, integrado en el genoma de la célula huésped). Las células huésped pueden mantenerse en condiciones adecuadas para la expresión (p.ej., en presencia de medios adecuados, inductores, suplementados con sales, factores de crecimiento, antibióticos, suplementos nutricionales, etc., apropiados), por lo que se produce(n) el(los) polipéptido(s) codificado(s). Si se desea, el anticuerpo humanizado codificado puede aislarse, por ejemplo, de las células huésped, medio de cultivo, o leche. Este proceso abarca la expresión en una célula huésped (p.ej., una célula de glándula mamaria) de un animal o planta transgénica (p.ej., tabaco) (véase p.ej., el documento WO 92/03918).

Ligandos CD80

El diseño y la construcción de ligandos CD80 se pretende para maximizar la especificidad del ligando por CTLA-4 sobre CD28. La secuencia de CD80 se conoce en la técnica, ejemplo citado en Wu et al., 1997. El CD80 comprende un dominio tipo variable Ig-V extracelular, y un dominio tipo constante IgC intracelular. En una realización preferida, el dominio extracelular de CD80 se usa como un ligando. Por ejemplo, véase SEQ ID NO: 15, especialmente los residuos 1-241.

Pueden hacerse mutaciones en el CD80 humano para mejorar la afinidad de unión, y para mejorar la selectividad por CTLA4 sobre CD28. Véase, por ejemplo, Wu et al., 1997.

Pueden hacerse mutantes distintos de W84A, que incluyen K71G, K71V, S109G, R123S, R123D, G124L, S190A, S201A, R63A, M81A, N97A, E196A. Véase Peach et al., *JBC* 1995, 270(6):21181-21187. La evaluación de la afinidad de unión de los mutantes tanto por CTLA-4 como por CD28 puede efectuarse mediante mutagénesis dirigida al sitio seguida por la expresión de los polipéptidos mutantes, y determinación de Kd mediante resonancia de plasmones superficiales que usa chips Biacore CTLA-4 y CD28. Véase, por ejemplo, Guo et al., (1995) *J. Exp. Med.* 181:1345-55.

Los mutantes que tienen perfiles de unión y selectividad ventajosos pueden seleccionarse, y evaluarse adicionalmente en ensayos basados en células. Por ejemplo, puede usarse citometría de flujo para probar el efecto de CD80 de tipo salvaje o mutante transfectado en las células.

Ligandos LAG-3

LAG-3 se ha descrito en la técnica, y el sitio de unión a la proteína MHCII se ha caracterizado. Véase Huard et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(11):5744-9. LAG-3 tiene cuatro dominios tipo Ig extracelulares, y pueden introducirse mutaciones en estos dominios para optimizar la unión a MHCII.

La efectividad de las mutaciones puede analizarse como se describe anteriormente al respecto de los ligandos CD80.

En un aspecto, solo los dominios 1 y 2 (D1 y D2) de los cuatro dominios tipo Ig de LAG-3 se usan en un ligando según la invención. Se cree que estos dominios son responsables de la interacción con la proteína MHCII.

Constructos de ligando biespecífico

La construcción de un ligando biespecífico sigue la fórmula general "ligando-conector-ligando". Los anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica, y se describen anteriormente.

La construcción de ligandos biespecíficos implicó preferiblemente la construcción y expresión de un gen apropiado que codifica el polipéptido deseado. Otros métodos de construcción mezclando los dos polipéptidos bajo condiciones que permiten la unión covalente, iónica o hidrófoba. En realizaciones preferidas, comprende unir de forma covalente los polipéptidos. Donde se construye una molécula biespecífica que comprende tres componentes, tales como un ligando CTLA-4, un conector y un ligando MHC, dos de los tres pueden combinarse, unirse y el tercer polipéptido añadirse posteriormente al producto de fusión, y unirse para crear un producto de fusión que comprende los tres polipéptidos.

Los polipéptidos de acuerdo con la presente invención pueden producirse mediante cualquier técnica deseada, que incluye síntesis química, aislamiento a partir de muestras biológicas y expresión de un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido. Los ácidos nucleicos, a su vez, pueden sintetizarse o aislarse desde fuentes biológicas, y modificarse por mutagénesis dirigida al sitio si se desea.

La invención se relaciona por consiguiente con vectores que codifican un ligando biespecífico según la invención, o un fragmento del mismo. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de fago, plásmido, viral o retroviral.

Los ácidos nucleicos según la descripción pueden ser parte de un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un huésped. Generalmente, un vector de plásmido se introduce en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado.

Si el vector es un virus, puede empaquetarse *in vitro* usando una línea celular de empaquetado apropiada y después transducirse a células huésped.

El inserto de ácido nucleico se une de forma operativa a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp, phoA y tac de *E. coli*, los promotores SV40 temprano y tardío y los promotores de LTRs retrovirales. Se conocen otros promotores adecuados por los expertos en la técnica. Los constructos de expresión contienen además sitios para la iniciación de transcripción, terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La parte de codificación de los transcritos expresados por los constructos incluye preferiblemente un codón de iniciación de la traducción al comienzo y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) colocado de forma apropiada al final del polipéptido a traducir.

Como se indica, los vectores de expresión incluyen preferiblemente al menos un marcador seleccionable. Dichos marcadores incluyen dihidrofolato reductasa, genes de resistencia a G418 o neomicina para el cultivo de células eucariotas, y de resistencia a tetraciclina, canamicina o ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias. Ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen, pero no están limitados a, células bacterianas, tales como *E. coli*, células de *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura (p.ej. *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*); células de insectos tales como células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células animales tales como células CHO, COS, HEK293, y melanoma de Bowes; y células de plantas.

Se conocen en la técnica medios de cultivo y condiciones apropiadas para las células huésped descritas anteriormente y están disponibles comercialmente.

Entre los vectores preferidos para usar en bacterias incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de QIAGEN, Inc.; vectores pBluescript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene Cloning Systems, Inc.; y ptrc99a, pKK2233, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia Biotech, Inc. Entre los vectores eucariotas preferidos están pWLNEO, pSV2CAT, p0G44, pXTI y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia. Entre los vectores preferidos para usar en la expresión en células de mamífero se incluyen el vector pSG5, pCMV*SPORT6, pcDNA, pCEP4, pREP4, pCI, pSI y pBICEP-CMV. Los vectores de expresión preferidos para usar en sistemas de levadura incluyen, pero no están limitados a pYES2, pYDI, pTEFI/Zeo, pYES2/GS, pPCIZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, pHILD2, pHIL-SI, pPIC3.5K, pPIC9K y PA0815 (todos disponibles de Invitrogen, Carlsbad, CA).

La introducción del constructo en la célula huésped puede efectuarse por transfección en fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, infección u otros métodos. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, tal como Sambrook et al., referenciado anteriormente. Un polipéptido según la invención puede recuperarse y purificarse de cultivos de células recombinantes por métodos bien conocidos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción en ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía por hidroxilapatita y cromatografía con lectina. Más Preferiblemente, la cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") se emplea para la purificación.

Los polipéptidos según la presente invención también pueden recuperarse de fuentes biológicas, que incluyen fluidos corporales, tejidos y células, especialmente células derivadas de tejidos tumorales o tejidos tumorales sospechosos de un sujeto.

Además, los polipéptidos según la invención pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, véase Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman & Co., N.Y., y Hunkapiller et al., (1984) *Nature*, 310:105-111). Por ejemplo, un polipéptido que comprende todo o parte de un ligando biespecífico según la invención puede sintetizarse mediante el uso de un sintetizador de péptidos.

Los ligandos biespecíficos de acuerdo con la invención se describen en detalle en las SEQ IDs añadidas a la misma. SEQ ID NOs: 1 y 2 proporcionan ADN sustituto de ratón y secuencias de proteína de ligandos biespecíficos en que el ligando de CTLA-4 CD80w88a está emparejado con el ligando de MHC LAG-3, separado por la región Fc de IgG2a y una secuencia Gly-9 (G9). Una secuencia de etiqueta de His terminal (H6) se proporciona en el extremo C. Las SEQ ID NOs: 3 y 4 proporcionan ADN sustituto de ratón y secuencias de proteína para los mismos constructos que SEQ ID NOs: 1 y 2, excepto que la región Fc de IgG2a se sitúa en el extremo C del polipéptido LAG-3, de manera que los péptidos CD80 y LAG-3 están separados por G9 solo. Las dos disposiciones, con la región Fc entre los ligandos o en el extremo C de las mismas, se denominan como constructos de gen 1 y gen 2, respectivamente.

Las SEQ ID NOs: 5 y 6 proporcionan ADN humano y secuencias de proteína en que la secuencia de tipo salvaje se ha conservado. No se hacen mutaciones, o a CD80 o a LAG-3.

En las SEQ ID NOs: 7 y 8, se ha hecho una mutación W84A al CD80 humano (el equivalente a W88A en el ratón) y una mutación R75E se ha hecho en LAG-3. Las SEQ IDs restantes (NOs: 7-14) describen otras mutaciones en las secuencias CD80 y LAG-3.

Aplicaciones terapéuticas

La supresión de la actividad de células T es deseable en un número de situaciones en que se garantiza la inmunosupresión, y/o se da una condición autoinmune. Por consiguiente, la focalización en la interacción

CTLA4/MHC se indica en el tratamiento de enfermedades que implican una respuesta inmune inapropiada o indeseada, tal como inflamación, autoinmunidad, y condiciones que implican dichos mecanismos. En una realización, dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria. Ejemplos de dichas enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias se describen anteriormente.

5 En una realización, dicha enfermedad o trastorno es diabetes tipo 1 (DT1).

En otra realización, los ligandos según la invención se usan para ayudar en el trasplante inmunosuprimiendo al sujeto. Dicho uso alivia la enfermedad de injerto contra huésped. Para una descripción de tratamientos existentes de enfermedad de injerto contra huésped, véase Svenilson, (2005) *Bone Marrow Transplantation* 35:S65-S67, y las referencias citadas en ella. De forma ventajosa, los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con otras terapias disponibles.

10 Con respecto al tratamiento de enfermedades autoinmunes, la terapia de combinación puede incluir la administración de un ligando de la presente invención junto con un medicamento, que junto con el ligando comprende una cantidad efectiva para evitar o tratar dichas enfermedades autoinmunes. Donde dicha enfermedad autoinmune es diabetes tipo 1, la terapia de combinación puede abarcar uno o más de un agente que promueve el crecimiento de células beta-pancreáticas o mejora el trasplante de células-beta, tales como factores de crecimiento o supervivencia de células beta o anticuerpos antimoduladores. Donde dicha enfermedad autoinmune es artritis reumatoide, dicha terapia de combinación puede abarcar uno o más de metotrexato, un anticuerpo anti-TNF- α , una proteína de fusión de receptor de TNF- α -Ig, un anticuerpo anti-IL-6, o anti-IL17, o anti-IL-15 o anti-IL-21, un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (AINEs), o fármaco anti-reumático modificador de la enfermedad (FAME). Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente biológico tal como un agente anti-TNF (p.ej., Enbrel®, infliximab (Remicade®) y adalimumab (Humira®) o rituximab (Rituxan®)). Donde dicha enfermedad autoinmune es rechazo de trasplante hematopoyético, pueden administrarse factor(es) de crecimiento hematopoyético(s) (tal como eritropoyetina, G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-11, trombopoyetina, etc.) o agente(s) antimicrobiano(s) (tal como fármacos antibióticos, antivirales, antifúngicos). Donde dicha enfermedad autoinmune es soriasis, el agente adicional puede ser uno o más de brea y derivados de la misma, fototerapia, corticosteroides, ciclosporina A, análogos de vitamina D, metotrexato, inhibidores de proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK), además de agentes biológicos tales como agentes anti-TNF- α y Rituxan®. Donde dicha enfermedad autoinmune es una enfermedad inflamatoria intestinal (EII) tal como, por ejemplo, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, el agente adicional puede ser uno o más de aminosalicilatos, corticosteroides, inmunomoduladores, antibióticos, o agentes biológicos tales como Remicade® y Humira®.

El tratamiento de combinación puede realizarse de cualquier forma que se considere necesaria o conveniente por el experto en la técnica y para el propósito de esta memoria, no se contemplan limitaciones con respecto al orden, cantidad, repetición o cantidad relativa de los compuestos a usar en combinación. Por consiguiente, los anticuerpos según la presente invención para uso en terapia pueden formularse en composiciones farmacéuticas. La presente invención está relacionada también con composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos según la presente invención.

Composiciones farmacéuticas

En una realización preferida, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un ligando biespecífico según la invención, o un ligando o ligandos identificables por un método de ensayo como se define en el aspecto anterior de la descripción. Los ligandos pueden ser inmunoglobulinas, péptidos, ácidos nucleicos o pequeñas moléculas, como se trata en la presente memoria. Se denominan, en la siguiente discusión, como "compuestos".

Una composición farmacéutica según la invención es una composición de materia que comprende un compuesto o compuestos capaces de modular la actividad de las células T como un ingrediente activo. Típicamente, el compuesto está en forma de cualquier sal farmacéuticamente aceptable, o p.ej., donde sea apropiado, un análogo, forma de base libre, tautómero, racemato de enantiómeros, o combinación de los mismos. Los ingredientes activos de una composición farmacéutica que comprende el ingrediente activo según la invención se contemplan para mostrar la excelente actividad terapéutica, por ejemplo, en el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped, cuando se administra en una cantidad que depende del caso particular.

En otra realización, uno o más compuestos de la invención pueden usarse en combinación con cualquier compuesto reconocido por la técnica conocido por ser adecuado para tratar la indicación particular en el tratamiento de cualquiera de las condiciones mencionadas anteriormente. Por consiguiente, uno o más compuestos de la invención pueden combinarse con uno o más compuestos reconocidos por la técnica, conocidos por ser adecuados para tratar las indicaciones anteriores de manera que una única composición conveniente pueda administrarse al sujeto. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

55 Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente como se indique por las exigencias de la situación terapéutica.

El ingrediente activo puede administrarse de una manera conveniente tal como por las rutas oral, intravenosa (donde sea soluble en agua), intramuscular, subcutánea, intranasal, intradérmica o supositorios o por implante (p.ej., usando moléculas de liberación lenta).

5 Dependiendo de la ruta de administración, puede necesitarse que el ingrediente activo esté recubierto en un material para proteger dichos ingredientes de la acción de las enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar dicho ingrediente.

10 Para administrar el ingrediente activo mediante administración distinta de la parenteral, se recubrirá por, o se administrará con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el ingrediente activo puede administrarse en un adyuvante, co-administrarse con inhibidores de enzimas o en liposomas. El adyuvante se usa en su sentido más amplio e incluye cualquier compuesto de estimulación inmunológica tal como interferón. Los adyuvantes contemplados en la presente memoria incluyen resorcinoles, tensioactivos no iónicos tales como polioxietilenoileiléter y n-hexadecil-polietilénéter. Los inhibidores enzimáticos incluyen tripsina pancreática.

Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua además de liposomas convencionales.

El ingrediente activo puede administrarse también de forma parenteral o intraperitoneal.

15 Las dispersiones pueden prepararse también en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones normales de almacenaje y uso, estos preparados contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

20 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas (donde sean solubles en agua) o dispersiones estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersión inyectables estériles. En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista fácil jeringabilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenaje y debe conservarse frente a la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

25 La prevención de la acción de microorganismos puede proporcionarse mediante varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tirmerosal y similares. En ciertos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede proporcionarse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasen la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

30 Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando el ingrediente activo en la cantidad necesaria en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes enumerados anteriormente, según se necesiten, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el ingrediente activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y la técnica de secado por congelación que da un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de la disolución previamente filtrada estéril del mismo.

35 Como se usa en la presente memoria "vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. Salvo en el caso en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios en las composiciones.

40 Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de unidades de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adaptadas como dosificaciones unitarias para los mamíferos a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. Los requisitos para las nuevas formas de unidades de dosificación de la invención se dictan por y son directamente dependientes de (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular a alcanzar, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de combinación de dicho material activo para el tratamiento de la enfermedad en sujetos vivos que tienen una enfermedad en que la salud corporal está afectada.

55 Los principales ingredientes activos se componen para la conveniente y efectiva administración en cantidades efectivas con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado en forma de unidad de dosificación. En el caso de

composiciones que contengan ingredientes activos suplementarios, las dosificaciones se determinan en referencia a la dosis y manera de administración normales de dichos ingredientes.

5 Para facilitar la distribución de compuestos peptídicos, que incluyen anticuerpos, a las células, los péptidos pueden modificarse para mejorar su capacidad de cruzar una membrana celular. Por ejemplo, el documento US 5.149.782 describe el uso de péptidos fusogénicos, péptidos que forman un canal iónico, péptidos de membrana, ácidos grasos de cadena larga y otros agentes de mezcla con la membrana para aumentar el transporte de proteína a través de la membrana celular. Estos y otros métodos también se describen en los documentos WO 97/37016 y US 5.108.921.

10 En un aspecto adicional se proporciona el ingrediente activo de la invención como se define anteriormente para el uso en el tratamiento de la enfermedad o bien solo o en combinación con compuestos reconocidos en la técnica conocidos por ser adecuados para tratar la indicación particular. Consecuentemente se proporciona el uso de un ingrediente activo de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad asociada con una respuesta inmune aberrante.

15 Además, se proporciona un método para tratar una condición asociada con una respuesta inmune aberrante, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un ligando identificable usando un método de prueba como se describe anteriormente.

La invención se describe adicionalmente, solo con propósitos de ilustración, en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Diseño de una proteína de fusión biespecífica que se une a CTLA-4 y lo reticula al TCR por medio de MHC 11.

20 Para generar una proteína de fusión biespecífica que se una de forma selectiva y agonista a CTLA-4 y lo ligue simultáneamente al TCR, el CD80 mutante (CD80w88a, denominado en adelante como CD80wa) que se une a CTLA-4 pero tiene mínima afinidad por CD28 (Wu et al., 1997) se fusionó con LAG-3, un ligando natural de MHCII (Baixeras et al., 1992; Triebel et al., 1990). El CD80wa se unió a LAG-3 usando un conector compuesto por nueve glicinas, que a su vez estaba unido a la parte Fc de IgG2a de ratón para aumentar supuestamente su vida media circulante (Fig. 1A). En respuesta a un ligando de esta configuración, se esperaba que la unión a CTLA-4 y el ligado al TCR se diera de forma indirecta, por medio de la formación del complejo tri-molecular (CTLA-4/MHCII/TCR) en las sinapsis inmunológicas durante la activación temprana de las células T (Fig. 1B). Teóricamente, fuera del contexto de la sinapsis inmunológica, la unión de la proteína de fusión biespecífica a CTLA-4 o MHCII solos o tanto a CTLA-4 como a MHCII no llevaría a la inhibición de la actividad de células T. La unión de CTLA-4 mediante CD80wa se diseñó para desencadenar la señalización de CTLA-4 por medio del reclutamiento de fosfatasa a la cola citoplasmática de CTLA-4. Mientras, se pretendía que la unión de LAG-3 a MHCII trajera al CTLA-4 a las proximidades del TCR análogo, que se une al complejo pMHCII en la sinapsis inmune (Fig. 1B). Se esperaba que la combinación de estos dos sucesos de unión generara una señal inhibitoria al TCR. Se construyó también una proteína de fusión de control que comprendía CD80wa y Fc de IgG2a (Fig. 1A), que no sería capaz de reticular el CTLA-4 al TCR (Fig. 1C) ya que carecía de LAG-3.

35 Las proteínas de fusión de prueba y control se expresaron en células de ovario de hámster chino y se purificaron por cromatografía de afinidad en una columna de proteína G. Se eliminaron los agregados usando cromatografía de exclusión por tamaño. La proteína de fusión biespecífica de prueba (CD80wa-LAG-3-Fc) se denomina como BsB (secuencia de nucleótido: SEQ ID NO. 3; secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 4), y el constructo de control (CD80wa-Fc) se conoce como BsBΔ (secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO. 16; secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 17). Como se esperaba, ambas proteínas de fusión aparecieron como dímeros en geles SDS-PAGE no reductores (BsB, 200 kDa; BsBΔ 140 kDa) y como monómeros (BsB, 100 kDa; BsBΔ 70 kDa) en geles SDS-PAGE reductores. Sus identidades se confirmaron adicionalmente por electrotransferencia de Western, usando anticuerpos contra LAG-3 y CD80.

45 Ejemplo 2

BsB inhibe la activación de células T en una reacción de linfocitos mixtos alogénicos.

50 La capacidad relativa de BsB y BsBΔ para inhibir la activación de células T se evaluó en una reacción de linfocitos mixtos alogénicos midiendo la producción de IL-2. Las células T CD4⁺CD25⁻CD62L^{alto}CD44^{bajo} no tratadas anteriormente que se habían purificado procedentes de ratones BALB/c se mezclaron con APCs aisladas de ratones C75BL/6 en presencia o ausencia del BsB o BsBΔ. La IgG2a murina y el CTLA-4Ig, un inhibidor de co-estimulación que se une a CD80/86 y bloquea su unión a CD28, se incluyeron como controles negativo y positivo, respectivamente. La inclusión de BsB pero no de BsBΔ en la reacción de linfocitos mixtos inhibió la producción de IL-2 sin embargo no en el mismo grado que se consiguió mediante CTLA-4Ig (Fig. 2). Esta diferencia fue probablemente el resultado de la inhibición de células T mediada por BsB que se dio después de la inhibición mediada por CTLA-4Ig. Más específicamente, para BsB, la inhibición solo se dio después de que CTLA-4 se sobre-regulara después de la activación de células T. La incapacidad de BsBΔ para reducir la producción de IL-2 sugiere

fuertemente que la unión del CTLA-4 solo es insuficiente para evitar la activación de células T porque se necesita el reticulado simultáneo al TCR. Para excluir la posibilidad de que la parte LAG-3 de BsB juegue un papel en la inhibición de las células T, se probó LAG-3Ig en este ensayo y se verificó que no inhibía la activación de células T.

Ejemplo 3

5 BsB dirige la diferenciación de células T a Tregs.

La terminación temprana de la señalización de TCR por la retirada de la estimulación del antígeno, inhibición de la señalización de mTOR, estimulación de TCR sub-óptima debido a un antígeno de baja afinidad, o débil co-estimulación durante la activación de células T se ha mostrado que induce la expresión de Foxp3⁺ y desvía la diferenciación de células T hacia un fenotipo Treg (Delgoffe et al., (2009) *Immunity* 30:832-844; Haxhinasto et al., (2008) *J. Exp. Med.* 205:565-574; Sauer et al., (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:7797-7802). Como BsB fuerza la unión temprana del TCR mediante el CTLA-4 inducido por activación con la consecuente atenuación de la señalización de TCR, se evaluó también su capacidad para generar Tregs Foxp3⁺. Las células T CD4⁺CD62L^{alto}GFP⁺ sin tratar anteriormente preparadas a partir de ratones con genes externos insertados Foxp3-EGFP (Haribhai et al., (2007) *J. Immunol* 178:2961-2972) se mezclaron con APCs alogénicas tratadas con LPS en presencia de BsB o BsBΔ. El análisis por citometría de flujo de las células después de cinco días de cultivo revelaron un gran número de células T CD4⁺CD25⁺GFP⁺ entre las células tratadas con BsB (Fig. 3A, panel izquierdo medio) pero no entre las células tratadas con IgG2a de ratón (Fig. 3A, panel izquierdo superior) o el control de BsBΔ (Fig.3A, panel izquierdo inferior), sugiriendo que estas células T CD4⁺CD25⁺GFP⁺ eran Tregs Foxp3⁺. Para confirmar este descubrimiento, se recogieron medios de cultivo celular y se probaron para la firma de citoquinas de Treg, IL-10 y TGF-β (Cools et al., (2008) *J. Cell. Mol. Med.* 12:690-700). Se detectaron grandes cantidades de IL-10 y TGF-β en los medios de células tratadas con BsB (Fig. 3A, paneles izquierdos) pero no en los medios de células tratadas con BsBΔ o mlgG2a. Sorprendentemente, el CTLA-4Ig no indujo la generación de Tregs GFP⁺ o la producción de IL-10 y TGF-β. Sin estar atados a una teoría particular, el mecanismo por el que CTLA-4Ig acorta la respuesta de las células T es diferente del de BsB. LGA-3Ig solo o en combinación con BsBΔ también falló al inducir la generación de Tregs GFP⁺, sugiriendo que el reticulado mediado por BsB de CTLA-4 con el TCR se necesitaba para la inducción de Treg.

Ejemplo 4

La inducción de Tregs mediante BsB necesita TGF-β auto-estimulado.

La detección simultánea de niveles elevados de IL-10 y TGF-β después del tratamiento con BsB elevó la posibilidad de que las citoquinas, TGF-β en particular, jugaran un papel en facilitar la generación de Tregs (Fig. 3A). Para abordar esto, se recogieron medios de cultivo durante un periodo de cinco días y se analizaron para el contenido de citoquina y Treg Foxp3⁺. Se detectaron elevados niveles de IL-10 y TGF-β tan pronto como el día 2 después del tratamiento, y se detectaron Tregs Foxp3⁺ después del día 3. Sin estar atados a una teoría particular, la producción endógena de TGF-β presumiblemente estimulada por BsB, está implicada en la diferenciación de Treg. La adición de un anticuerpo anti-TGF-β (clon 1D11), pero no de un IgG de control de isotipo (clon 13C4), al ensayo de inducción de Treg bloqueó completamente la aparición de Tregs Foxp3⁺ (Fig. 3B). Sin estar atados a una teoría particular, la unión temprana de CTLA-4 y su posterior reticulado al TCR mediante BsB estimuló la producción de TGF-β endógeno, que a su vez incentivó la diferenciación de Treg. Se ha presentado anteriormente que el reticulado de CTLA-4 y el TCR induce la producción de TGF-β (Chen et al., (1998) *J. Exp. Med.* 188:1849-1857), aunque la diferenciación de Treg no se evaluó en este estudio.

Las Tregs han mostrado un considerable potencial terapéutico en la modulación de las manifestaciones de la enfermedad en varios modelos animales de enfermedades autoinmunes. Sin embargo, la importancia de la especificidad de las Tregs inducidas contra los antígenos relevantes se ha resaltado. Las Tregs no específicas de un antígeno que no se activarán contra autoantígenos particulares en el contexto de células T reactivas específicas de autoantígeno presumiblemente no son funcionalmente inmunosupresoras. Por tanto, las estrategias que facilitan la generación de grandes números de Tregs específicas de antígeno son altamente deseables para tratar estas dolencias. Además, las estrategias que facilitan la inducción por segunda vez de Tregs específicas de antígeno in situ (p.ej. en islotes del páncreas para DT1 o en la lámina propia para la colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn) se prefieren sobre el uso de transferencia adoptiva de Tregs diferenciadas o expandidas *in vitro*.

50 Ejemplo 5

Las Tregs inducidas por BsB son funcionalmente supresoras de una manera dependiente del contacto célula-célula.

Para evaluar si las Tregs inducidas por BsB eran funcionalmente supresoras, las Tregs inducidas por BsB y las Tregs inducidas por TGF-β, que servían como un control, se purificaron usando la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y se mezclaron con células T respondedoras singénicas marcadas con CFSE a diferentes relaciones y APCs alogénicas. Las células se co-cultivaron durante tres días en pocillos de cultivo polarizado o pocillos de cultivo normales, después de lo cual se analizó la proliferación de células T respondedoras usando citometría de flujo. Como se resume en la Fig. 5A, las Tregs inducidas tanto con BsB como con TGF-β cultivadas en

pocillos de cultivo normales casi inhibieron completamente la proliferación de las células T respondedoras. La potencia de la actividad supresora de las Tregs inducidas por BsB fue comparable a la de las Tregs inducidas por TGF- β . En contraste, las Tregs generadas por BsB o TGF- β no inhibieron significativamente la proliferación de las células T respondedoras cuando las células T estaban separadas de las Tregs en un pocillo de cultivo polarizado. Sin estar atados a una teoría particular, la actividad supresora de Treg depende del contacto célula-célula y no estaba mediada por citoquinas secretadas u otros factores. Admitiendo esta idea, la inclusión de un anticuerpo a IL-10 (clon JES5-2A5) en el pocillo de cultivo normal no afectó a la actividad supresora de las Tregs inducidas por BsB o TGF- β (Fig. 5B). La adición de un anticuerpo a TGF- β 1D11 tampoco afectó a la actividad supresora de las Tregs inducidas por BsB, aunque redujo parcialmente la supresión mediante Tregs inducidas por TGF- β (Fig. 5B).

10 Ejemplo 6

BsB dirige la diferenciación de células T OT-II a Tregs específicas de antígeno.

Como se encontró que una proteína de fusión bifuncional que comprende CD80wa y LAG3 (BsB) que reticula el CTLA-4 al TCR (por medio de MHCII) puede inducir la producción de Tregs Foxp3⁺ en una MLR alogénica, se examinó el potencial de BsB para desencadenar la producción de Tregs específicas de antígeno. Para investigar esta posibilidad, se purificaron células T OT-II sin tratar anteriormente de ratones transgénicos que alojan transgenes que codifican el TCR (subunidades α y β) específicos para un péptido de ovoalbúmina de pollo (323-339) (Barnden et al., 1998) y se mezclaron con APCs singénicas en presencia de Ova323-339. Después de 5 días de cultivo, se detectaron cantidades significativamente mayores de Tregs Foxp3⁺ en las células T OT-II que se habían tratado con BsB (Fig. 4A, panel izquierdo medio) que con el control mIgG (Fig. 4A, panel izquierdo superior) o con CTLA-4Ig (los datos no se muestran). Esta inducción de Tregs se inhibió por la inclusión de anticuerpo anti-TGF- β en los cultivos (Fig. 4A, panel izquierdo inferior). Sin estar atados a una teoría particular, la diferenciación se medió por TGF- β producido endógenamente de forma autocrina o paracrina. Los niveles de IL-2 se disminuyeron mientras que los de IL-10 y TGF- β se aumentaron en los medios de células tratadas con BsB (Fig. 4A, paneles derechos).

Para monitorizar la actividad proliferativa de las Tregs inducidas, se precargaron células OT-II con el trazador fluorescente, CFSE. Como se muestra en la Fig. 4B, se determinó que las Tregs Foxp3⁺ inducidas por BsB son proliferativas como se indica por una dilución de la señal CFSE. Como se esperaba, la adición de CTLA-4Ig, un bloqueante co-estimulador, redujo la proliferación de células T. Por tanto, BsB fue capaz de inhibir la activación de células T e inducir la producción de Tregs tanto en una disposición de MLR alogénica como específica del antígeno.

Ejemplo 7

30 La inducción de Tregs por BsB puede implicar la atenuación de la ruta de señalización AKT/mTOR.

Recientes informes han indicado que las rutas de señalización de AKT y mTOR juegan papeles importantes en la determinación de destino de las células T. La presencia de AKT constitutivamente activo en las células T disminuye la diferenciación Treg de una forma sensible a la rapamicina (Haxhinasto et al., 2008), sugiriendo que las rutas de señalización de AKT y mTOR se cruzan para influir en el destino de Treg. Además, las células T deficientes en mTOR diferencian a las Tregs más fácilmente que las células T de control normales (Delgoffe et al., (2009) *Immunity* 30:832-844). Un papel obligatorio para las moléculas co-inhibidoras PD-1/PD-L1 en el control del desarrollo de Treg adaptativa antagonizando a AKT/mTOR también se ha presentado (Francisco et al., (2009) *J. Exp. Med.* 206:3015-3029). Para determinar si estas rutas todavía están implicadas en la inducción mediada por BsB de las Tregs, se co-inmovilizaron los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 con BsB, mIgG, o PD-L1 en placas de 96 pocillos, en los que se sembraron células T sin tratar anteriormente. Dieciocho horas después de la activación, las células se tiñeron con anticuerpos marcados de forma fluorescente frente a AKT y mTOR fosforilados y se analizaron por citometría de flujo. La fosforilación tanto de AKT como de mTOR se atenuó por la co-inmovilización con BsB y PD-L1 (Fig. 6). Sin estar atados a ninguna teoría particular, los casos de señalización mediada por moléculas inhibitoras de CTLA-4 y PD-L1 pueden converger en algún punto a lo largo de la ruta de señalización de AKT/mTOR durante la activación de células T para regular la diferenciación de Treg.

Ejemplo 8

La exposición a BsB sostiene la expresión de Foxp3⁺ en Tregs inducidas.

Las Tregs inducidas *in vitro*, a diferencia de las Tregs naturales totalmente comprometidas, son supuestamente menos estables y pueden perder la expresión Foxp3⁺ en el cultivo extendido en ausencia del inductor inicial (p.ej., TGF- β o ácido retinóico) (Selvaraj y Geiger, (2007) *J. Immunol.* 178:7667-7677). En el estudio actual, las Tregs inducidas por BsB mostraron una inestabilidad similar, con algunas células perdiendo la expresión Foxp3 después de un cultivo repetido (Fig. 7). Para probar si la re-estimulación mediante BsB podría prolongar la expresión Foxp3, las Tregs se indujeron primero recubriendo placas de 96 pocillos tanto con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 como con BsB. Las Tregs purificadas se sometieron entonces a una vuelta adicional de cultivo en presencia o ausencia de BsB. La re-estimulación de las Tregs purificadas con BsB permitió el mantenimiento de una gran población (~93% de las Tregs totales) de Tregs Foxp3⁺ (Fig. 7, panel derecho inferior), en comparación con el ~40% de expresión de Foxp3 en respuesta al control IgG (Fig. 7, panel derecho superior).

Ejemplo 9

Farmacocinéticas de BsB en ratones.

Antes de probar la utilidad terapéutica de BsB en modelos animales de enfermedades autoinmunes, su perfil farmacocinético se determinó para ayudar a diseñar un régimen de dosificación *in vivo*. La inyección intraperitoneal de BsB en ratones C57BL/6 dio por resultado una elevación medible en los niveles circulantes seguido por rápido aclaramiento con una vida media ($t_{1/2}$) en plasma estimada de ~12 h (Fig. 8A). Este perfil fue inesperado ya que las farmacocinéticas de las proteínas de fusión que contienen Fc o anticuerpos es típicamente más prolongado. Como la unión de anticuerpos al receptor Fc neonatal (FcRn) es principalmente responsable de sus prolongadas vidas medias (Roopenian y Akilesh, 2007), se compararon las capacidades relativas de BsB y una IgG2a de ratón de control para unirse a FcRn. La Figura 8B muestra que las características de unión de ambas proteínas al FcRn fueron muy similares indicando que era improbable que un defecto en la unión de BsB a FcRn fuera la causa de su rápido aclaramiento de la circulación.

Otra explicación potencial para el rápido aclaramiento de BsB podría ser debido a su absorción por receptores de carbohidratos en células que no son diana. Ejemplos de dichos receptores incluyen el receptor de asialoglucoproteína (ASGPR) en hepatocitos (Weigel, 1994) y el receptor de manosa en macrófagos y células endoteliales del sistema reticuloendotelial (Pontow et al., 1992). El análisis de BsB usando el servidor NetNGlyc sugirió que tenía el potencial de albergar hasta 10 cadenas laterales de oligosacárido unidas a asparagina por monómero (Fig. 9). Un análisis de la composición de monosacáridos indicó que BsB contenía aproximadamente 37 residuos de manosa, y todos los sitios de glucosilación unidos a asparagina predichos podían haberse usado porque cada uno de estos glucanos de oligosacárido unido a asparagina contiene la estructura del núcleo de manosa con tres residuos de manosa (un total de 30 residuos de manosa). Además, una pequeña cantidad de oligosacáridos tipo manosa alta puede existir también para explicar los residuos de manosa extra. De hecho, se identificaron cantidades significativas de oligosacáridos unidos a asparagina tri- y tetra-antenaria, poco sialilados, además de algunos oligosacáridos tipo manosa alta, por espectrometría de masas de glucanos permetilados liberados desde la proteína.

Esta proyección es también consecuente con el peso molecular de BsB de 100 kDa como se indica por un análisis SDS-PAGE, en oposición con el peso calculado de BsB de 80 kDa. La presencia añadida de oligosacáridos contribuyó a la diferencia (20 kDa) en peso molecular. Además, BsB mostró una relación de ácidos siálicos a galactosa de 0,68 (Fig. 9), que indica que los glucanos estaban sialilados de forma incompleta. Sin estar atados a una teoría particular, el aclaramiento mediado por carbohidrato de BsB mediante ASGPR contribuyó a su rápido aclaramiento de la circulación.

Ejemplo 10

Un tratamiento corto con BsB retrasó el comienzo de la diabetes autoinmune en ratones NOD.

Como la CE_{50} de BsB para inducir Tregs *in vitro* se estimó que era aproximadamente 100 nM y su vida media circulante era corta ($t_{1/2}$ a ~12 h), se probó BsB en ratones NOD en un paradigma de prevención tardía. Se administró BsB a ratones NOD durante un corto intervalo (cada dos días durante 4 semanas) cuando tenían entre 9 y 12 semanas de edad. A esta edad, las células T autorreactivas y la insulinitis eran ya evidentes aunque los ratones tenían aún que desarrollar diabetes manifiesta. Como se muestra en la Figura 10A, los ratones NOD tratados durante 2 semanas con BsB mostraron un aumento modesto aunque estadísticamente significativo (25%) en el número de Treg Foxp3⁺ en sangre cuando se compara con los controles tratados con solución salina. Sin embargo, este aumento en Tregs fue temporal ya que fue imposible detectar una diferencia en el número de Tregs después de 4 semanas de tratamiento o a puntos temporales posteriores. Un aumento temporal similar en Tregs en órganos linfoides se notó anteriormente después del tratamiento de ratones NOD con un anticuerpo anti-CD3 (Nishio et al., 2010). Sin estar atados a una teoría particular, las Tregs inducidas por BsB pueden haber revertido a células T Foxp3⁻ después del cese del tratamiento. También pueden haberse reclutado por tejidos diana específicos (p.ej. páncreas) para ejecutar su función. En cualquier caso, este corto tratamiento con BsB en un paradigma de prevención tardía parece retrasar de forma modesta el comienzo de la enfermedad y disminuir el número de ratones que presentan DT1 manifiesta (Fig. 10B).

La modesta respuesta notada puede haberse debido a la presencia de insulinitis activa en los ratones NOD de 9 semanas de edad antes del comienzo de la terapia. Se ha mostrado que un entorno inflamatorio favorece la conversión de células T activadoras a células Th17 y suprime su conversión a Tregs. También se ha mostrado que las citoquinas inflamatorias tales como IL-6 o IL-4 inhiben la conversión a Treg y promueven la pérdida de expresión Foxp3⁺ en Tregs (Caretto et al., 2010; Kastner et al., 2010; Koenen et al., 2008). Para sortear estos desafíos, los ratones NOD se trataron comenzando a una edad más temprana (4 semanas de edad) antes de la inducción manifiesta de células T autorreactivas e insulinitis. También se incluyó CTLA-4lg como un control positivo en este estudio ya que Bluestone y colegas (Lenschow et al., 1995) habían demostrado un beneficio usando este agente en este modelo; se usó mIgG2a como un control negativo adicional a la solución salina. En contraste con los resultados en ratones mayores (Fig. 10A), el número de Tregs Foxp3⁺ en la sangre periférica de ratones NOD más jóvenes tratados durante 2 semanas con BsB no aumentó por encima de los administrados con solución salina o mIgG (Fig. 11A). Sin estar atados a una teoría particular, esto podría ser porque el número de células T auto-reactivas en los

ratones NOD de 4 semanas de edad (en contraste con los ratones de 9-12 semanas de edad usados en el estudio anterior) fue muy bajo. El número de Tregs específicas de antígeno inducidas fue probablemente demasiado pequeño para registrarlo por encima de los niveles basales presentes en los animales. Una incidencia significativamente menor de DT1 se notó en ratones NOD administrados con BsB cuando se compara con los controles tratados con solución salina antes de las 24 semanas de edad (Fig. 11B). Sin embargo, este beneficio se redujo en los últimos puntos temporales.

Coherente con el informe de ratones NOD administrados con CTLA-4Ig (Salomon et al., 2000), los niveles de Tregs en sangre (Fig. 11A) fueron significativamente bajos presumiblemente por los efectos de los CTLA-4Ig en la señalización de CD28/B7 (Tang et al., 2003). El tratamiento con CTLA-4Ig además agravó la enfermedad con los ratones mostrando un comienzo más temprano de la enfermedad (Fig. 11B) y mayor penetración de enfermedad cuando se compara con los controles tratados con solución salina y mlgG (Fig. 11B). La razón para la discrepancia entre estos descubrimientos y los presentados por Bluestone y colegas (Lenschow et al., 1995) no está claro pero puede deberse a las diferencias en el CTLA-4Ig usado o el régimen de dosis empleado. En los actuales estudios, se usó una dosis de 10 mg/kg de CTLA-4Ig humano (Orencia) en vez de 2,5 mg/kg de CTLA-4Ig de ratón por Bluestone y colegas. Además, el tratamiento de BsB no se extendió más allá de las 7 semanas. Sin estar atados a una teoría particular, el uso de una mayor dosis de CTLA-4Ig permitió un bloqueo más completo de la señal co-estimuladora necesaria para la homeostasis de Treg.

Ejemplo 11

Un tratamiento más largo con BsB retrasó significativamente el comienzo y redujo la incidencia de diabetes autoinmune en ratones NOD.

Razones potenciales para los modestos beneficios observados de BsB al abordar la enfermedad en ratones NOD en los estudios previos incluyen la utilización de un tratamiento relativamente corto, la potencia moderada de BsB al inducir la producción de Tregs (CE_{50} a >100 nM), y la corta vida media circulante de BsB que puede haber limitado su exposición. Como la potencia y la vida media circulante de BsB son intrínsecas a la molécula y por lo tanto no dispuestas a cambiar fácilmente, se probó un tratamiento más largo. Para este fin, se trataron ratones NOD con BsB durante 10 semanas en vez de 4 semanas comenzando cuando los ratones tenían 4 semanas de edad. Como se muestra en la Figura 12A, los ratones NOD tratados durante 10 semanas con BsB mostraron un retraso significativo en el comienzo de DT1. De forma importante, a las 35 semanas de edad, solo el ~13% de ratones NOD tratados con BsB desarrollaron DT1 en comparación con más del 70% en los controles tratados con solución salina. Por consiguiente, el tratamiento ampliado de ratones NOD con BsB parece haber protegido a los animales del desarrollo de diabetes autoinmune.

A la conclusión del estudio (cuando los ratones tenían 35 semanas de edad), los animales se sacrificaron y sus páncreas se recogieron para el análisis histopatológico. Se tiñeron secciones en serie adyacentes con H&E para una evaluación general de los islotes, se sondaron con un anticuerpo anti-insulina para detectar la presencia de insulina en las células β , y se tiñeron de forma doble con anticuerpos anti-CD3 y anti-Foxp3 para localizar células T y Tregs.

Debido a la heterogeneidad genética de los ratones NOD, un pequeño número de los animales no tratados no desarrollaron la enfermedad a las 35 semanas de edad. El análisis de los islotes de estos animales no diabéticos (de la cohorte tratada con solución salina) mostró que las células β estaban intactas sin evidencia obvia de infiltración linfocítica o insulinitis, (Fig. 12B, paneles a-c). Unas pocas células Treg Foxp3⁺ estaban presentes en los islotes de estos ratones (flechas en el panel c). En contraste, los islotes de ratones NOD diabéticos (de la cohorte tratada con solución salina) reveló la presencia de insulinitis invasiva (Fig. 12B, panel d) y la completa destrucción de las células β (panel e). Además de células T CD3⁺ y Tregs Foxp3⁺, también fueron evidentes grandes números de linfocitos de células que no son T (Fig. 12B, panel f). Se notaron descubrimientos histopatológicos similares en los correspondientes ratones tratados con BsB que permanecieron libres de enfermedad al final del estudio o que desarrollaron DT1 durante el estudio. De forma interesante, en ~50% de los islotes de ratones NOD tratados con BsB que permanecieron no diabéticos, se notó la evidencia de peri-insulinitis (Fig. 12B, panel g); sin embargo, las células β estaban bien conservadas (Fig. 12B, panel h). La tinción con anticuerpos indicó que las células en la periferia de los islotes comprenden principalmente células T CD3⁺ y Tregs. (Fig. 12B, panel i). Una ampliación de una sección de la imagen (cuadrado rojo en la Fig. 12B, panel i) reveló claramente la presencia de numerosas Tregs Foxp3⁺ (flechas amarillas en la Fig. 12B, panel j) que estaban intercaladas con células T no Foxp3⁺ sino CD3⁺ (cabezas de flecha negras en la Fig. 12B, panel j) además de mononucleocitos de células que no son T (núcleos azules). El desarrollo de peri-insulinitis se ha notado en ratones NOD jóvenes (4-10 semanas de edad) (Anderson y Bluestone, 2005) y en ratones mayores tratados con otros agentes terapéuticos eficaces que retrasaron o revirtieron el nuevo comienzo de DT1 en ratones NOD (Chatenoud et al., 1994; Daniel et al., 2011; Simon et al., 2008; Vergani et al., 2010). Por tanto, un tratamiento más largo de ratones NOD con BsB protegió a los animales del desarrollo de insulinitis invasiva y DT1 manifiesta. Sin estar atados a una teoría particular, esto se midió, al menos en parte, por la inducción por segunda vez y posiblemente in situ de Tregs específicas de antígeno de islotes.

Reticular CTLA-4 y TCR por medio de MHCII usando una nueva proteína de fusión biespecífica (BsB) indujo de forma eficaz a la producción de Tregs específicas de antígeno además de las citoquinas anti-inflamatorias, IL-10 y TGF- β . Estudios anteriores mostraron que las Tregs son críticas para dar tolerancia inmunológica y que las Tregs

específicas de antígeno son más eficaces en los modelos animales de enfermedades autoinmunes. BsB se evaluó adicionalmente en modelos animales de enfermedades autoinmunes, tal como DT1. Sin estar atados a una teoría particular, se hipotetizó que si BsB promovía la inducción de Tregs específicas de antígeno durante la fase temprana de activación de células T autorreactivas en ratones NOD podía retrasar el comienzo o parar la progresión de la enfermedad convirtiendo las células T autorreactivas que están experimentando activación a Tregs.

A pesar de que BsB muestra una modesta potencia (debido a su moderada afinidad por el MHC-II y TCR) y una corta vida media circulante (que limitó su exposición), un tratamiento corto retrasó de forma reproducible el comienzo de DT1 en ratones NOD tratados a una temprana edad (entre 4-6 semanas de edad) y cuando fueron más mayores (entre 9-12 semanas de edad). Sin embargo, los beneficios observados fueron modestos y no sostenidos. Un tratamiento más largo (10 semanas) de ratones NOD (entre 4 y 13 semanas de edad) con BsB retrasó significativamente el comienzo de la enfermedad y la incidencia de los animales que desarrollaron DT1. Sin estar atados a una teoría particular, este beneficio se dio por la generación por segunda vez de Tregs inducidas que se produjeron o localmente (p.ej. en el páncreas o nódulos linfáticos de drenaje pancreático) o distalmente que después se reclutaron al páncreas para proteger los islotes de la destrucción por células T autorreactivas y otros leucocitos de células que no son T. La tinción inmunohistoquímica de secciones de tejidos pancreáticos de ratones tratados con BsB de 35 semanas de edad que permanecieron no diabéticos indicó claramente un aumento en el número de Tregs Foxp3⁺ en la periferia de los islotes. Visualmente, parecía que estaban evitando que las células T CD3⁺ y linfocitos de células que no son T entraran a los islotes. Este fenómeno se observó en ~50% de los islotes de ratones NOD tratados con BsB que permanecieron no diabéticos al final del estudio pero en ninguno de los islotes de animales diabéticos del grupo de control. Los islotes de unos pocos ratones no diabéticos en el grupo de control permanecieron desprovistos de infiltraciones linfocíticas y estuvieron libres de insulinitis. Se sabe que por la heterogeneidad genética de los ratones NOD, unos pocos animales en una cohorte de este tamaño nunca desarrollan diabetes en este periodo de tiempo. En el restante ~50% de los animales no diabéticos en el grupo tratado con BsB, los islotes también estuvieron desprovistos de infiltraciones linfocíticas y libres de insulinitis. Las posibilidades para el estado libre de enfermedad de estos ratones incluyen tratamiento BsB y el contexto genético.

Coherente con los descubrimientos histopatológicos, un aumento pequeño aunque estadísticamente significativo en el número de Tregs Foxp3⁺ se detectó en la sangre de animales tratados con BsB (tratados desde las 9-12 semanas de edad) cuando se compara con controles no tratados. Este aumento no fue evidente en ratones que comenzaron el tratamiento a una edad más temprana (4 semanas de edad). Sin estar atados a una teoría particular, esto puede ser porque más células T autorreactivas estuvieron experimentando la activación en los ratones de 9 semanas de edad que en los de 4 semanas de edad. Los bajos niveles de células T autorreactivas en los ratones de 4 semanas de edad podrían haber impedido la detección de Tregs inducidas aparte de aquellas en el entorno existente de Tregs. El aumento en Tregs también fue de naturaleza temporal. Como se notó una observación similar en los animales sometidos a terapia anti-CD3 (Nishio et al., 2010), es posible que las Tregs inducidas fueran inestables y perdieran la expresión de Foxp3. Es más concebible que las Tregs se reclutaran de la circulación a tejidos diana afectados. En contraste, los ratones NOD tratados con CTLA-4lg mostraron una disminución significativa en el número de Tregs circulantes. El tratamiento agravó además la enfermedad como se evidenció por un comienzo acelerado de la enfermedad y una mayor incidencia de animales que presentaban enfermedad manifiesta. Esto es coherente con los informes previos que muestran que la ruta co-estimuladora está implicada en la homeostasis de Treg y que una falta de co-estimulación reduce la producción de Tregs. Bloquear o eliminar CD80 o CD86 en ratones NOD también da por resultado un comienzo más temprano de DT1 (Salomon et al., 2000, Tang et al., 2003).

La aparición de peri-insulinitis se observa típicamente en el páncreas de ratones NOD de entre 4 y 9 semanas de edad. Si no se controla, la insulinitis invasiva continúa llevando a la completa destrucción de células β y el desarrollo de diabetes manifiesta entre las 12 y 35 semanas de edad. Los páncreas de ratones NOD no diabéticos que se habían tratado durante 10 semanas con BsB y se habían analizado a las 35 semanas de edad mostraron evidencia de peri-insulinitis que parecía haberse detenido en su progresión. No se notó ninguna indicación de insulinitis invasiva o destrucción excesiva de células β productoras de insulina. Hay otros informes de diferentes intervenciones terapéuticas que retrasan o previenen de forma similar la enfermedad en ratones NOD (Shoda et al., 2005). Los resultados aquí son los más parecidos a los presentados por Lee et al. (2010), que mostró que la transferencia de células T CD4⁺CD25^{BDC2.5} diabetogénicas carentes de Tregs CD4⁺CD25⁺ en ratones NOD/SCID hembras aceleró el desarrollo de insulinitis invasiva cuando se compara con ratones administrados con células T CD4⁺ totales que contenían Tregs CD4⁺CD25⁺. La insulinitis invasiva estaba controlada en gran medida por la infiltración de células dendríticas (DC) más que por células T BDC2.5 per se. Los autores supusieron por su estudio que las Tregs regulaban la invasividad de DCs en los islotes modulando, al menos en parte, la quimiotaxis de DCs en respuesta a las quimioquinas CCL19 y CCL21 secretadas por los islotes. Los patrones de tinción inmunohistoquímica para Tregs Foxp3⁺, células T CD3⁺ y leucocitos de células que no son T notados en las secciones pancreáticas de ratones NOD no diabéticos, tratados con BsB son coherentes con sus descubrimientos (Fig. 12B). Sin estar atados a una teoría particular, las Tregs producidas en ratones NOD en respuesta a BsB probablemente actuaron para detener la migración de células T autorreactivas y linfocitos de células que no son T a los islotes. Un tratamiento más largo con BsB fue más efectivo porque éste generó una inducción más fuerte y sostenida de Tregs. Que la estimulación continua de Tregs inducidas con BsB en los cultivos celulares extendió la expresión de Foxp3⁺ en Tregs es el apoyo de esta idea (Karman et al., 2012).

La terapia celular que usa Tregs recién aisladas, expandidas *ex vivo* o inducidas *in vitro* en modelos animales de enfermedades autoinmunes o trasplantes de órganos ha demostrado que la transferencia adoptiva de Tregs puede restaurar el equilibrio de Tregs frente a células T efectoras, controlando así la exuberante autoinmunidad asociada con estas enfermedades (Allan et al., 2008; Jiang et al., 2006; Riley et al., 2009; Tang et al., 2012). Sin embargo, el uso de transferencia adoptiva como una estrategia terapéutica presenta varios desafíos para el traslado a la clínica. En primer lugar, el número de Tregs autólogas que pueden aislarse de la sangre periférica de un humano es limitante. Por tanto la expansión extensiva *ex vivo* de las Tregs es a menudo necesaria, lo que puede alterar su funcionalidad y pureza. En segundo lugar, como las Tregs aisladas son policlonales, pueden ejercer una función supresora paninmune en células T efectoras que no son diana. En tercer lugar, y lo más importante, la plasticidad de las Tregs plantea un desafío significativo (Bluestone et al., 2009; Zhou et al., 2009a). Se ha mostrado que las Tregs transferidas de forma adoptiva pueden perder la expresión de Foxp3 y rediferenciarse en células Th17 (Koenen et al., 2008) o células T de memoria patogénica (Zhou et al., 2009b) que elevan el riesgo de agravar la autoinmunidad o inflamación. Consecuentemente, un agente terapéutico que induce la generación de Tregs de una manera específica de antígeno *in situ* es más ventajoso que la terapia celular Treg adoptiva. Los resultados presentados en la presente memoria demuestran la utilidad y efectividad de dicho agente (BsB) que reticula el CTLA-4 a MHCII en el contexto de un modelo de ratón de DT1. La demostración combinada de producción de IL-10, TGF- β y Tregs en respuesta al tratamiento con BsB además de la eficacia en el modelo de ratón NOD de DT1 tiene el potencial de proporcionar un nuevo concepto terapéutico. BsB también ofrece ventajas adicionales sobre otros moduladores inmunológicos en que no afecta a las células T en reposo u otros linfocitos. Los números y porcentajes de células T CD4⁺ y células B CD19⁺ en la periferia permanecieron igual en todos nuestros estudios NOD. Sin estar atados a una teoría particular, esta estrategia es efectiva para retrasar o detener de la progresión de la enfermedad. El desarrollo de variantes de BsB que sean más potentes y que alberguen un perfil farmacocinético más favorable debería confirmar estos estudios. Por consiguiente, este concepto puede aplicarse también hacia la gestión de otras enfermedades mediadas por el sistema inmunitario.

Los resultados presentados en la presente memoria se obtuvieron usando los siguientes métodos y materiales a menos que se indique otra cosa.

Animales. Ratones hembras C57BL/6 (H-2^b) tipo salvaje, BALB/c(H-2^d), OT-II transgénicos, que expresan el receptor de célula T de cadena α y cadena β de ratón específico para ovoalbúmina 323-339 (Ova₃₂₃₋₃₃₉) de pollo en un contexto genético C57BL/6, y ratones hembras diabéticos no obesos (NOD/LtJ) se compraron de The Jackson Laboratory. Los animales se mantuvieron en una instalación libre de patógenos y los estudios se realizaron de acuerdo con las directrices expedidas por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. (Publicación NIH núm. 86-23) y por el comité institucional del Cuidado y uso animal de Genzyme.

Anticuerpos y reactivos. Se compraron anticuerpos CD3 anti-ratón (clon 145-2C11), CD25, insulina y Foxp3⁺ de grado funcional o marcados de forma fluorescente de eBioscience o BD Biosciences. Se compraron CTLA-4-Fc murino y CTLA-4Ig humano (Orencia) de R&D Systems, Inc. y Bristol-Myers Squibb, respectivamente. El control de isotipo IgG2a de ratón se obtuvo de BioXCell Inc. CFSE, suero bovino fetal (SBF) de Ig ultrabajo y otros medios de cultivo celular fueron de Invitrogen. El péptido Ova₃₂₃₋₃₃₉ de pollo se obtuvo de New England Peptide.

Construcción y producción de la proteína de fusión biespecífica BsB. La construcción y expresión de la proteína de fusión biespecífica (BsB) que comprende los dominios extracelulares de CD80w88a y LAG-3 además del Fc de IgG2a de ratón (CD80wa-LAG-3-Fc, BsB) se describieron anteriormente (Karman et al., 2012).

Ensayos Biacore y análisis de composición de monosacáridos. Se usó Biacore para comparar la unión de BsB y mIgG2a al receptor Fc neonatal de ratón (FcRn). Brevemente, un chip CM5 se inmovilizó con ~1430 RU de FcRn-HPC4 de ratón usando química de amina. Cada muestra se diluyó en serie 1:2 a concentraciones finales de entre 200 y 6,25 nM en PBSP (PBS con 0,005% de Tensioactivo P-20), pH 6,0 y se inyectó durante 3 min por duplicado, seguido por 3 min de lavado con tampón de disociación. La superficie se regeneró con borato sódico 10 mM y NaCl 1M, pH 8,5. La composición de monosacáridos de carbohidrato de BsB se analizó según el protocolo descrito por Zhou et al. (Zhou et al., 2011).

Aislamiento de células T no tratadas anteriormente. Las células T no tratadas anteriormente de los bazo y nódulos linfáticos de ratones BALB/c u OT-II hembras de 8-12 semanas de edad se purificaron por separación magnética seguida por clasificación celular activada por fluorescencia. Las células se seleccionaron primero de forma negativa por separación celular magnética (Miltenyi Biotech) y después se clasificaron como células CD4⁺CD25⁻CD62L^{alto}CD44^{bajo} a una pureza de más de 98%.

Ensayo de inducción de Treg específica de antígeno. Los ensayos en una disposición de MLR alogénica se realizaron como se presenta anteriormente (Karman et al., 2012). Para la activación de células T específicas de antígeno, se mezclaron 10⁵ células T OT-II sin tratar anteriormente en placas de 96 pocillos de fondo redondo con 10⁵ APCs singénicas irradiadas en presencia de Ova₃₂₃₋₃₂₉ a 0,5 μ g/ml y 1 μ g/ml de anti-CD28 soluble (clon 37.51, eBioscience). Los constructos de prueba, IgG2a de ratón, o CTLA-4Ig de ratón se añadieron a las células cultivadas a una concentración de saturación de 100 μ g/ml. Las células se cultivaron durante 5 días para inducir la producción de Tregs y se analizaron por citometría de flujo. Los medios se recogieron para el análisis de IL-2, IL-10 y TGF- β usando kits ELISA por las instrucciones del fabricante. Para evaluar la proliferación de células T, se marcaron

células T OT-II sin tratar anteriormente purificadas con CFSE 5 μ M durante 5 min a 37°C. Después se lavaron para eliminar el CFSE no unido y se usaron en ensayos de inducción de Treg como se describe anteriormente. Las células se cultivaron durante 5 días para permitirles dividirse antes de analizarse por citometría de flujo. Para detectar Foxp3⁺ en las células T, las células se tiñeron por marcadores de superficie como se describe anteriormente seguido por permeabilización con tampón Fix/Perm (eBioscience) y tinción con anticuerpo anti-Foxp3 conjugado con PE-Cy7 (clon FJK-16s, eBioscience).

Medidas farmacocinéticas de BsB en ratones. La farmacocinética de BsB se determinó en ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad. Se administró 20 mg/kg de BsB en ratones por inyección intraperitoneal. La sangre se recogió por sangrado de la vena safena a 1 h, 5 h, 24 h, 48 h y 72 h después de la administración. Los niveles de BsB en cada punto temporal se midieron usando un ensayo ELISA. Brevemente, 100 μ l (1 μ g/ml) de un anticuerpo CD80 anti-ratón en PBS se recubrieron en placas de 96 pocillos y se incubaron toda la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con suero bovino fetal al 5% durante 1 h, después de lo que se lavaron 4 veces con PBS. Se añadió después 100 μ l de muestras sanguíneas a diversas diluciones en los pocillos. Las placas se incubaron durante 2 h con agitación suave a temperatura ambiente y se lavaron 4 veces con PBS. Se añadió anticuerpo LAG-3 anti-ratón biotinilado (1 μ g/ml) y se incubó durante 2 h. Las placas se lavaron 4 veces con PBS después de lo cual se añadió estreptavidina-HRP. Después de 30 min, las placas se lavaron 6 veces con PBS y se desarrollaron por medida colorimétrica. Se usaron como patrones BsB purificado diluido en diluyente de ensayo a diversas concentraciones.

Tratamiento de ratones NOD con BsB. En el tratamiento corto, se trataron ratones NOD hembra de 4 semanas de edad con solución salina, 20 mg/kg de BsB, 20 mg/kg de IgG2a de ratón, o 10 mg/kg de CTLA-4lg humano (Orencia) tres veces a la semana por inyección intraperitoneal durante un periodo de 2,5 semanas. Para el modelo de prevención tardía, se trataron ratones NOD de 9-12 semanas de edad con solución salina o 20 mg/kg de BsB como anteriormente durante 4 semanas. Para el tratamiento más largo, se trataron ratones NOD con BsB o solución salina como anteriormente durante 10 semanas desde una edad de 4 semanas a 13 semanas. Se monitorizaron los niveles de glucosa en sangre no en ayunas semanalmente empezando a las 8 semanas de edad. Los ratones se consideraron diabéticos cuando sus lecturas de glucosa fueron mayores de 300 mg/dL durante tres lecturas consecutivas. Las Tregs Foxp3⁺ en sangre periférica se examinaron después de dos semanas de tratamiento por citometría de flujo. Brevemente, 50 μ l de sangre completa se bloqueó con anti-FcyRIIb y FcgRIII (clon 93, eBioscience) sin marcar durante 20 min. Las células se tiñeron posteriormente con anticuerpo anti-CD4 marcado de forma fluorescente durante 30 min y después se lavaron. Se lisaron los glóbulos rojos usando disolución de lisado FACS (BD Biosciences) durante 5 min. Después del lavado, las células se fijaron, permeabilizaron y tiñeron con un anticuerpo anti-Foxp3 marcado con FITC durante 30 min como se describe anteriormente. Los páncreas se cortaron por la mitad con una mitad fija en formalina en tampón neutro y la otra colocada en compuesto OCT y después congelada en hielo seco.

Análisis estadístico. Las incidencias acumulativas de ratones NOD que presentan DT1 e hiperglucemia después del tratamiento con BsB o controles se compararon usando la prueba de rango logarítmico (Cox-Mantel) en Prism 5 (Graphpad, ciudad y estado). Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Análisis histopatológico. El páncreas fijado con formalina en tampón neutro se tiñó para las células CD3, Foxp3⁺ usando un procesador automatizado. Las secciones de tejido se desparafinaron usando xileno-etanol, los antígenos se recuperaron incubando durante 25 min en tampón citrato y después se bloquearon con suero. Se incubaron portaobjetos con un anticuerpo anti-CD3 durante 45 min, seguido por un polímero de cabra anti-conejo rábano peroxidasa durante 20 min. La visualización con cromógeno de CD3 se obtuvo incubando con tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina durante 2-4 min. Para detectar Foxp3⁺, las secciones se bloquearon de nuevo con suero, seguido por exposición a un anticuerpo anti-Foxp3 durante 45 min. Los portaobjetos se incubaron después con un anticuerpo IgG anti-rata conejo durante 30 min, seguido por un polímero de cabra anti-conejo fosfatasa alcalina. La visualización con cromógeno se consiguió usando Fast Red durante 10 min. Las secciones de tejido se contratiñeron usando hematoxilina durante 2 min y se lavaron 3 veces con Tween-20 al 0,05%/solución salina tamponada con Tris entre etapas. Las secciones en serie adyacentes se tiñeron usando un anticuerpo anti-insulina como se describe anteriormente. Se tomaron fotografías usando un microscopio fluorescente Nikon Eclipse E800 con una cámara digital anexada de Diagnostic Inc. y las imágenes se obtuvieron usando el software Spot Advanced.

SECUENCIAS

Leyenda

CD80w88a = ligando de CTLA-4

IgG2a = región Fc de IgG2

5 G9 = Gly 9

Lag-3 = ligando de MHC

H6 = His 6

SEQ ID NO. 1:

CTLA-4 BsB (Gen1) = CD80w88a(aa1-235)-IgG2a(aa241-474)-G9-Lag-3(aa25-260)-H6 de ratón

10 Secuencia de nucleótidos del constructo sustituto de ratón (Gen1):

ATGGCTTGCAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTC
 CAAGGCTCATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTTCGTCTTTCACAAGTGTCTTCAGA
 TGTTGATGAACAACTGTCCAAGTCAGTGAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCG
 TTACAACCTCTCCTCATGAAGATGAGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACAT
 GACAAAGTGGTGTCTGTCTGTCATTGCTGGGAAACTAAAAGTGGCGCCCCGAGTAT
 AAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTTATCATCCTGGGCCTGG
 TCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTGTCGTFCAAAAAGAAGGAAAGAGGAA
 CGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAGCTGACTTCTC
 TACCCCCAACATAACTGAGTCTGGAAACCCATCTGCAGACACTAAAAGGATTAC
 CTGCTTTGCTFCCGGGGGITTCCCAAAGCCTCGCTTCTCTTGGTTGGAAAATGG
 AAGAGAATTACCTGGCATCAATACGACAATTTCCCAGGATCCTGAATCTGAATTG
 TACACCATTAGTAGCCAACACTAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGT
 GTCTCATFAAATATGGAGATGCTCACGTGTGAGAGGACTTCACCTGGGAGCCCA
 GAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCT
 TGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTAICTCATGA
 TCTCCCTGAGCCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGAC
 CCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTACTCACAGCTCAG
 ACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTC
 CCCATCCAGCACAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAA
 CAACAAAGCCCTCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGT
 CAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTA
 AGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTT
 ACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAA

ES 2 694 749 T3

CCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAA
AAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGCTCAGTGGTCCACGAGGG
TCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAAGGCG
GTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTGGGCCTGGGAAAGAGCTCCCGTGGTGT
GGGCCAGGAGGGAGCTCCCGTCCATCTTCCCTGCAGCCTCAAATCCCCAAC
CTGGATCCTAACTTTCTACGAAGAGGAGGGGTTATCTGGCAACATCAACCAGAC
AGTGGCCAACCCACTCCCATCCCGGCCCTTGACCTTACCAGGGGATGCCCTC
GCCTAGACAACCCGCACCCGGTGCCTACACGGTGTGAGCGTGGCTCCAGGA
GGCCTGCGCAGCGGGAGGCAGCCCCTGCATCCCCACGTGCAGCTGGAGGAGC
GCGGCCTCCAGCGCGGGGACTTCTCTCTGTGGTTGCGCCAGCTCTGCGCAC
CGATGCGGGCGAGTACCACGCCACCGTGCGCCTCCCGAACCGCGCCCTCTCC
TGCAGTCTCCGCCTGCGCGTCCGCCAGGCCTCGATGATTGCTAGTCCCTCAGG
AGTCCTCAAGCTGTCTGATTGGTCCTTTTGAACTGCTCCTTCAGCCGTCTGA
CCGCCAGTCTCTGTGCACTGGTTCCAGGGCCAGAACCGAGTGCCTGTCTACA
ACTCACCGCGTCATTTTTAGCTGAAACTTTCCTGTTACTGCCCCAAGTCAGCCC
CCTGGACTCTGGGACCTGGGGCTGTGTCTCACCTACAGAGATGGCTTCAATG
TCTCCATCACGTACAACCTCAAGGTTCTGGGTCTGGAGCCCGTAGCCCACCATC
ACCATCATCACTGA

SEQ ID NO. 2:

CTLA-4 BsB (Gen1) = CD80w88a(aa1-235)-IgG2a(aa241-474)-G9-Lag-3(aa25-260)-H6 de ratón

Secuencia de proteína traducida del constructo sustituto de ratón (Gen1):

MACNCQLMQDTPLLKFPCLILLFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYN
SPHEDESEDRIYWQKHDKVLSVIAGKLVVAPEYKNRTLYDNTTYSLILGLVLSDRG
TYSCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPK
PRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSED
FTWEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLISLSPMVT CVVVDVSE
DDPDVQISWVNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV
NNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE
WTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN
HHTTKSFSRTPGKGGGGGGGGGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCSLKSPNLDPNF
LRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGGLRSGR
QPLHPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCSLRLRVGQ
ASMIASPSGVLKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGNRVPVYNSPRHFLAETF
LLLPQVSPLDSGTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAHHHHHH

SEQ ID NO. 3:

CTLA-4 BsB (Gen2) = CD80w88a(aa1-235)-G9-Lag-3(aa25-260)-IgG2a(aa241-474) de ratón

Secuencia de nucleótidos del constructo sustituto de ratón (Gen 2):

ATGGCTTGAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTC
 CAAGGCTCATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTGCTCTTTCACAAGTGTCTTCAGA
 TGTGATGAACAACACTGTCCAAGTCAGTGAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCG
 TTACAACTCTCCTCATGAAGATGAGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACAT
 GACAAAGTGGTGTCTGTCTGTCATTGCTGGGAAACTAAAAGTGGCGCCCGAGTAT
 AAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTCTTATCATCCTGGGCCTGG
 TCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTGCTTCAAAAGAAGGAAAGAGGAA
 CGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAGCTGACTTCTC
 TACCCCAACATAACTGAGTCTGGAAACCCATCTGCAGACACTAAAAGGATTAC
 CTGCTTTGCTTCCGGGGTTTCCCAAAGCCTCGCTTCTCTTGGTTGGAAAATGG
 AAGAGAATTACCTGGCATCAATACGACAATTTCCAGGATCCTGAATCTGAATTG
 TACACCATTAGTAGCCAACACTAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGT
 GTCTCATTAAATATGGAGATGCTCACGTGTCAGAGGACTTCACCTGGGGCGGTG
 GCGGCGGAGGCGGTGGCGGTGGGCCTGGGAAAGAGCTCCCCGTGGTGTGGG
 CCCAGGAGGGAGCTCCCGTCCATCTTCCCTGCAGCCTCAAATCCCCAACCTG
 GATCCTAACTTTCTACGAAGAGGAGGGTTATCTGGCAACATCAACCAGACAGT
 GGCCAACCCACTCCCATCCCGGCCCTTGACCTTACCAGGGGATGCCCTCGCC
 TAGACAACCCGCACCCGGTCGCTACACGGTGCTGAGCGTGGCTCCAGGAGGC
 CTGCGCAGCGGGAGGCAGCCCCTGCATCCCCACGTGCAGCTGGAGGAGCGCG
 GCCTCCAGCGCGGGGACTTCTCTCTGTGGTTGCGCCCAGCTCTGCGCACCGAT
 GCGGGCGAGTACCACGCCACCGTGCGCCTCCCGAACCGCGCCCTCTCCTGCA
 GTCTCCGCTGCGCGTCCGCCAGGCCTCGATGATTGCTAGTCCCTCAGGAGTC
 CTCAAGCTGTCTGATTGGGTCTTTTTGAACTGCTCCTTCAGCCGTCCTGACCGC
 CCAGTCTCTGTGCACTGGTTCCAGGGCCAGAACCGAGTGCCTGTCTACAACCTC
 ACCGCGTCATTTTTTAGCTGAAACTTTCTGTTACTGCCCAAGTCAGCCCCCT
 GGACTCTGGGACCTGGGGCTGTGTCTCACCTACAGAGATGGCTTCAATGTCT
 CCATCACGTACAACCTCAAGGTTCTGGGTCTGGAGCCCGTAGCCCCCAGAGGG
 CCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGT
 GGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTAATCATGATCTCC
 CTGAGCCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGA
 TGTCCAGATCAGCTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTACTCACAGCTCAGACACA
 AACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCAT
 CCAGCACCAAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACA
 AAGCCCTCCAGCGCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTA
 AGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAA
 CAGGTCACTCTGACCTGCATGGTACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTG
 GAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGT
 CCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAA
 GAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGCTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGC
 ACAATCACACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAATGA

SEQ ID NO. 4:

ES 2 694 749 T3

CTLA-4 BsB (Gen2) = CD80w88a(aa1-235)-G9-Lag-3(aa25-260)-IgG2a(aa241-474) de ratón

Secuencia de proteína traducida del constructo sustituto de ratón (Gen 2):

MACNCQLMQDTPLLKFPCPRLILLFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYN
SPHEDESEDRIYWQKHDKVLSVIAGKLVKVAPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRG
TYSCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPK
PRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSED
FTWGGGGGGGGGGGGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCKSLKSPNLDPNFLRRGGVIWQ
HQPDSGQPTIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGGLRSGRQPLHPHVQLE
ERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCSLRLRVGQASMIASPSGVL
KLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGNRVPVYNSPRHFLAETFULLPQVSPLDS
GTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVFI
FPPKIKDVLMISSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVLTAQTQTHREDYNST
LRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE
EMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYFMYSKLR
VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO. 5:

Secuencia de nucleótidos de tipo salvaje del constructo humano CTLA-4 BsB = CD80(aa1-234)-G9-Lag-3(aa27-262-IgG1a(aa241-471) humano

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGCCATACCTCAA
TTTCTTTT CAGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTT CAGGTGTTATC
CACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGT
TTCTGTTGAAGAGCTGGCACAAACTCGCATCTACTGGCAAAAGGAGAAGAAAAT
GGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATATGGCCCCGAGTACAAGAACC

ES 2 694 749 T3

GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAAAAGACGCTTT
CAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTAC
ACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAACCTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCT
CAACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAG
AATTAATGCCATCAACACAACAGTTTCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGC
TGTTAGCAGCAAACCTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTC
ATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGC
GGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGG
GCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCC
AGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGAC
AGTGGCCCCGCCGCTGCCGCCCGGCCATCCCCTGGCCCCGGCCCTCACC
CGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCCGCGCTACACGGTGCTGAG
CGTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGT
CCAGCTGGATGAGCGCGGCCGCGCAGCGCGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGC
CCAGCCCCGCGCGCGGACGCCGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGG
GACCGCGCCCTCCTGCCGCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGA
CTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCATTTTGAACTGCT
CCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGC
CAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCACTTAGCGGAAAGCTT
CCTCTTCTGCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCC
TCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGG
GTCTGCTGGTGCCCCGGGGCTCCGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
TGCCACCCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTT
CCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC
CATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

SEQ ID NO. 6:

Secuencia de proteína traducida de tipo salvaje del constructo humano CTLA-4 BsB = CD80(aa1-234)-G9-Lag-3(aa27-262-IgGla(aa241-471) humano

ES 2 694 749 T3

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV
EELAQTRIWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHL
SWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF
NWNNTGGGGGGGGGGSGAEVPPWQAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQ
HQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQP
RVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMT
ASPPGSLRASDVVVILNCSFSRDPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHHLAESFL
FLPQVSPMDSGPWGCILT YRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 7:

Secuencia 1 de nucleótidos variante del constructo humano CTLA-4 BsB = CD80W84A/S190A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgGlaN596/297Q(aa240-471) humano

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAA
TTTCTTTTCTCAGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTTCTCAGGTGTTATC
CACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCTGTGGTCCACAATGT
TTCTGTTGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAGGAGAAGAAAAT
GGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATAGCCCCGAGTACAAGAACC
GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAAAGACGCTTT
CAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTAC
ACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAACCTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCT
CAACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAG
AATTAATGCCATCAACACAACAGTTGCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGC
TGTTAGCAGCAAACCTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTC
ATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGC
GGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGG

ES 2 694 749 T3

GCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCC
AGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACCTGGCAGCATCAGCCAGAC
AGTGGCCCGCCCGCTGCCGCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACC
CGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCGAGCGCTACACGGTGCTGAG
CGTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGT
CCAGCTGGATGAGCGCGGCCGGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGC
CCAGCCCGGCGCGCGGACGCCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGG
GACCGCGCCCTCCTGCCGCCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGA
CTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCATTTTGAAGTCT
CCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGC
CAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCCTTAGCGGAAAGCTT
CCTCTTCCCTGCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCC
TCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGG
GTCTGCTGGTGCCCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
AGCCCACCGAGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCTCTT
CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCC
CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

SEQ ID NO. 8:

Secuencia 1 de proteína traducida variante del constructo humano CTLA-4 BsB = CD80W84A/S190A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgGlaN596/297Q(aa240-471) humano

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKVKEVATLSCGHNVSV
EELAQTRIWQKEKKMVLTMMSGDMNIAPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHL
SWLENGEELNAINTTVAQDPETELYAVSSKLDNFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF

ES 2 694 749 T3

NWNTTGGGGGGGGSGAEVPPVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTW
QHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPERYTVLSVGPGLRSGRLPLQ
PRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM
TASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHHLAESFL
FLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPPS
PAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 9:

Secuencia 2 de nucleótidos variante del constructo humano CTLA-4 BsB = CD80W84A/S190AS201A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgGlaN596/297Q(aa240-471) humano

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAA
TTTCTTTTCTCAGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTTCTCAGGTGTTATC
CACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCTGTGGTCAACAATGT
TTCTGTTGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAAGGAGAAGAAAAT
GGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATAGCCCCGAGTACAAGAACC
GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTICTGAAGTATGAAAAAGACGCTTTC
AAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTACA
CCTAGTATATCTGACTTTGAAATCCAACTTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCTC
AACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAGA
ATTAATGCCATCAACACAACAGTTGCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGCT
GTTGCCAGCAAAGTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTCA
TCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGCG
GTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGGG
CCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCCA
GGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGACA
GTGGCCCCGCGCTGCCGCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACCC
GGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCGAGCGCTACACGGTGTGAGC
GTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGTC
CAGCTGGATGAGCGCGGCCGCGCAGCGCGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGCC
CAGCCCCGCGCGCGGACGCCGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGGG
ACCGCGCCCTCCTGCCGCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGACT

ES 2 694 749 T3

GCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCAATTTGAACTGCTC
CTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGGCC
AGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCCTTAGCGGAAAGCTTC
CTCTTCTGCCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCCT
CACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGGG
TCTGCTGGTGCCTCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAA
GCCCACCGAGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCTCTTC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATG
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA
CCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGTCTCCAACAAAAGCCCTCCAGCCCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
CACCTGCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCT
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGGTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

SEQ ID NO. 10:

Secuencia 2 de proteína traducida variante del constructo humano CTLA-4 BsB = CD80W84A/S190AS201A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgG1aN596/297Q(aa240-471) humano

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKVKEVATLSCGHNVSV
EELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIAPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHL
SWLENGEELNAINTTVAQDPETELYAVASKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF
NWNTTGGGGGGGGGGSGAEVPVWVAQEGAPALPCSPITPLQDLSLLRRAGVTW
QHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSWSGPRPERYTVLSVGPGLRSGRLPLQ
PRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM
TASPPGSLRASDWVILNCSFSRPPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFL
FLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPPS
PAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 11:

Secuencia 3 de nucleótidos variante del constructo humano CTLA-4 BsB = CD80E196A/5190A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgG1aN596/297Q(aa240-471) humano

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAA
 TTTCTTTTCTCAGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTTCAAGTGTATC
 CACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCCTGTGGTCACAATGT
 TTCTGTTGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAGGAGAAGAAAAT
 GGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATATGGCCCGAGTACAAGAACC
 GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
 ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAAAAGACGCTTT
 CAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTAC
 ACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAACCTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCT
 CAACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAG
 AATTAATGCCATCAACACAACAGTTGCCCAAGATCCTGAAACTGCCCTCTATGC
 TGTTAGCAGCAAACCTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTC
 ATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGC
 GGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGG
 GCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCC
 AGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACCTGGCAGCATCAGCCAGAC
 AGTGGCCCGCCCGCTGCCGCCCGCGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACC
 CGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCCGAGCGCTACACGGTGTGAG
 CGTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGT
 CCAGCTGGATGAGCGCGGCCGGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGC
 CCAGCCCGGCGCGCGGACGCCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGG
 GACCGCGCCCTCTCCTGCCGCCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGA
 CTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCAATTTGAACTGCT
 CCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGGC
 CAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCACTTAGCGGAAAGCTT
 CCTCTTCTGCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCC
 TCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGG
 GTCTGCTGGTGCCCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
 AGCCACCGAGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCCTCAGTCTTCCTCTT
 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
 GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
 ACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGG
 CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCC
 CATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
 ACACCCTGCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACC
 TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
 TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
 GCTCCTTCTTCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
 GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

ES 2 694 749 T3

SEQ ID NO. 12:

Secuencia 3 de proteína traducida variante del constructo humano CTLA-4 BsB = CD80E196A/S190A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgG1aN596/297Q(aa240-471) humano

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKVKEVATLSCGHNVS
EELAQTRIWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHL
SWLENGEELNAINTTVAQDPETALYAVSSKLDNFMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF
NWNTTGGGGGGGGGGSGAEVPPVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTW
QHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPERYTVLSVGPGLRSGRLPLQ
PRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM
TASPPGSLRASDVVILNCSFSRDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPIHHLAESF
LFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPP
SPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 13:

Secuencia 4 de nucleótidos variante del constructo humano CTLA-4 BsB = CD80E196A/S190AS201A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgG1aN596/297Q(aa240-471) humano

ES 2 694 749 T3

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAA
TTTTTTTTCAGCTCTTGGTGTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTTCAAGTGTATC
CACGTGACCAAGGAAGTAAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCGTGGTCAACAATGT
TTCTGYFGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAGGAGAAGAAAAAT
GGTGTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATATGGCCCGAGTACAAGAACC
GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAAAAGACGCTTT
CAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTAC
ACCTAGTATATCTGACTTTGAAATCCAACTTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCT
CAACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAG
AATTAATGCCATCAACACAACAGTTGCCCAAGATCCTGAACTGCCCTCTATGC
TGTTGCCAGCAAACCTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTC
ATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGC
GGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGG
GCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCC
AGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACCTGGCAGCATCAGCCAGAC
AGTGGCCCGCCGCTGCCGCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACC
CGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCGAGCGCTACACGGTGCTGAG
CGTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGT
CCAGCTGGATGAGCGCGGCCGCGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGC
CCAGCCCCGCGCGCGGACGCCGGCGAGTACCGCGCGCGGTGCACCTCAGG
GACCGCGCCCTCCTGCCGCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGA
CTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCATTTTGAAGTGT
CCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGTTTTCGGAACCGGGGC
CAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCACTTAGCGGAAAGCTT
CCTCTCCTGCCCAAGTACGCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCC
TCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGG
GTCTGTGGTGCCCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
AGCCCACCGAGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCCTCAGTCTTCTCTT
CCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAAGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCC
CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACC
TGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO. 14:

Secuencia 4 de proteína traducida variante del constructo humano CTLA-4 BsB = CD80E196A/S190AS201A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgG1aN596/297Q(aa240-471) humano

ES 2 694 749 T3

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV
EELAQTRIYWQKEKMMVLTMMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHL
SWLENGEELNAINTTVAQDPETALYAVASKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF
NWNTTGGGGGGGGGGSGAEVPPVWAQEGAPQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTIN
QHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGP RPERYTVLSVGPGLRSGRLPLQ
PRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM
TASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHHLAESFL
FLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPPS
PAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 15

CD80 humano

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSC
GHNVSV EELAQTRIYWQKEKMMVLTMMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLS
IVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPSISDF
EIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVAQDPETALYAV
SSKLDNFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHFDDNLLPSWAIT
LISVNGIFVICCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV

SEQ ID NO. 16

ADN de BsBA (CD80wa-Fc) = CD80w88a(aa1-235)-IgG2a(aa241-474) de ratón

Secuencia de nucleótidos del constructo sustituto de ratón (BsBA; CD80wa-Fc):

ATGGCTTGAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTC
CAAGGCTCATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTTCGTCTTTCACAAGTGTCTTCAGA
TGTTGATGAACAACACTGTCCAAGTCAGTGAAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCG
TTACAACCTCTCCTCATGAAGATGAGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACAT
GACAAAGTGGTGTCTGTCTGTCATTGCTGGGAAACTAAAAGTGGCGCCCGAGTAT
AAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTCTTATCATCCTGGGCCTGG
TCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCTGTTCAAAAAGAAGGAAAGAGGAA
CGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAGCTGACTTCTC
TACCCCAACATAACTGAGTCTGGAAACCCATCTGCAGACACTAAAAGGATTAC
CTGCTTTGCTTCCGGGGTTTCCCAAAGCCTCGCTTCTCTTGGTTGGAAAATGG
AAGAGAATTACCTGGCATCAATACGACAATTTCCAGGATCCTGAATCTGAATTG
TACACCATTAGTAGCCAACACTAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGT
GTCTCATTAATATGGAGATGCTCACGTGTCAGAGGACTTCACCTGGGAGCCCA
GAGGGCCCAACATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCT
TGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTAICTCATGA
TCTCCCTGAGCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGAC
CCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTACTCACAGCTCAG
ACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTC
CCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAA
CAACAAAGCCCTCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGT
CAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTA
AGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTT
ACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAA
CCAGTCCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAA
AAGAAGAAGTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGCTCAGTGGTCCACGAGGG
TCTGCACAATCACCACAGCTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAAGGCG
GTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTGGGCCTGGGAAAGAGCTGGGTCTGGAGC
CCGTAGCCCACCATCACCATCATCACTGA

SEQ ID NO. 17

Proteína de BsBΔ (CD80wa-Fc) = CD80w88a(aa1-235)-IgG2a(aa241-474) de ratón

Secuencia de proteína traducida del constructo sustituto de ratón (BsBΔ; CD80wa-Fc):

MACNCQLMQDTPLLKFPCLILLFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYN
SPHEDESEDRIYWQKHDKVVLVSVIAGKLVKVAPEYKNRTLYDNNTYSLIILGLVLSDRG
TYSCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPK
PRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDHVS
FTWEPRGPTIKPCPPCKPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLISLSPMVTVCVVVDVSE
DDPDVQISWFVNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV
NNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE
WTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN
HHTTKSFSRTPGKGGGGGGGGGGPGKELGLEPVAHHHHHH

Otras realizaciones

A partir de la descripción precedente, será evidente que pueden hacerse variaciones y modificaciones a la invención descrita en la presente memoria para adaptarla a diversos usos y condiciones.

- 5 La lectura de un listado de elementos en cualquier definición de una variable en la presente memoria incluye definiciones de esa variable como cualquier elemento sencillo o combinación (o subcombinación) de los elementos enumerados. La lectura de una realización en la presente memoria incluye esa realización como cualquier realización sencilla o en combinación con cualquier otra realización o parte de la misma.

Referencias

Los siguientes documentos se citan en la presente memoria.

- 10 Allan, S.E., R. Broady, S. Gregori, M.E. Himmel, N. Locke, M.G. Roncarolo, R. Bacchetta, and M.K. Levings. 2008. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev* 223:391-421.
- Anderson, B.E., J.M. McNiff, C. Matte, I. Athanasiadis, W.D. Shlomchik, and M.J. Shlomchik. 2004. Recipient CD4+ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease. *Blood* 104:1565-1573.
- 15 Anderson, M.S., and J.A. Bluestone. 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23:447-485.
- Barnden, M.J., J. Allison, W.R. Heath, and F.R. Carbone. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76:34-40.
- 20 Baroja, M.L., L. Vijaykrishnan, E. Bettelli, P.J. Darlington, T.A. Chau, V. Ling, M. Collins, B.M. Carreno, J. Madrenas, and V.K. Kuchroo. 2002. Inhibition of CTLA-4 function by the regulatory subunit of serine/threonine phosphatase 2A. *J Immunol* 168:5070-5078.
- Bettini, M., A.L. Szymczak-Workman, K. Forbes, A.H. Castellaw, M. Selby, X. Pan, C.G. Drake, A.J. Korman, and D.A. Vignali. 2011. Cutting edge: accelerated autoimmune diabetes in the absence of LAG-3. *J Immunol* 187:3493-3498.
- 25 Blair, P.J., J.L. Riley, B.L. Levine, K.P. Lee, N. Craighead, T. Francomano, S.J. Perfetto, G.S. Gray, B.M. Carreno, and C.H. June. 1998. CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J Immunol* 160:12-15.
- Bluestone, J.A., C.R. Mackay, J.J. O'Shea, and B. Stockinger. 2009. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 9:811-816.
- 30 Caretto, D., S.D. Katzman, A.V. Villarino, E. Gallo, and A.K. Abbas. 2010. Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells. *J Immunol* 184:30-34.
- Chatenoud, L., E. Thervet, J. Primo, and J.F. Bach. 1994. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:123-127.
- 35 Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S.M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886.
- Chuang, E., T.S. Fisher, R.W. Morgan, M.D. Robbins, J.M. Duerr, M.G. Vander Heiden, J.P. Gardner, J.E. Hambor, M.J. Neveu, and C.B. Thompson. 2000. The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity* 13:313-322.
- 40 Daniel, C., B. Weigmann, R. Bronson, and H. von Boehmer. 2011. Prevention of type 1 diabetes in mice by tolerogenic vaccination with a strong agonist insulin mimotope. *J Exp Med* 208:1501-1510.
- Fife, B.T., M.D. Griffin, A.K. Abbas, R.M. Locksley, and J.A. Bluestone. 2006. Inhibition of T cell activation and autoimmune diabetes using a B cell surface-linked CTLA-4 agonist. *J Clin Invest* 116:2252-2261.
- 45 Gonzalez-Rey, E., A. Fernandez-Martin, A. Chorny, and M. Delgado. 2006. Vasoactive intestinal peptide induces CD4+,CD25+ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 54:864-876.
- Griffin, M.D., D.K. Hong, P.O. Holman, K.M. Lee, M.J. Whitters, S.M. O'Herrin, F. Fallarino, M. Collins, D.M. Segal, T.F. Gajewski, D.M. Kranz, and J.A. Bluestone. 2000. Blockade of T cell activation using a surface-linked single-chain antibody to CTLA-4 (CD152). *J Immunol* 164:4433-4442.

- Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M.L. Belladonna, R. Bianchi, M.C. Fioretti, and P. Puccetti. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3:1097-1101.
- 5 Guntermann, C., and D.R. Alexander. 2002. CTLA-4 suppresses proximal TCR signaling in resting human CD4(+) T cells by inhibiting ZAP-70 Tyr(319) phosphorylation: a potential role for tyrosine phosphatases. *J Immunol* 168:4420-4429.
- Ise, W., M. Kohyama, K.M. Nutsch, H.M. Lee, A. Suri, E.R. Unanue, T.L. Murphy, and K.M. Murphy. 2010. CTLA-4 suppresses the pathogenicity of self antigen-specific T cells by cell-intrinsic and cell-extrinsic mechanisms. *Nat Immunol* 11:129-135.
- 10 Jain, N., H. Nguyen, C. Chambers, and J. Kang. 2010. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1524-1528.
- Jiang, S., R.I. Lechler, and G. Lombardi. 2006. CD4+CD25+ regulatory T-cell therapy. *Expert review of clinical immunology* 2:387-392.
- 15 Karandikar, N.J., C.L. Vanderlugt, T.L. Walunas, S.D. Miller, and J.A. Bluestone. 1996. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* 184:783-788.
- Karman, J., J.L. Jiang, N. Gumlaw, H. Zhao, J. Campos-Rivera, J. Sancho, J. Zhang, C. Jiang, S.H. Cheng, and Y. Zhu. 2012. Ligation of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 to the TCR inhibits T cell activation and directs differentiation into FOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem*
- 20 Kastner, L., D. Dwyer, and F.X. Qin. 2010. Synergistic effect of IL-6 and IL-4 in driving fate revision of natural Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 185:5778-5786.
- Kehrl, J.H., L.M. Wakefield, A.B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M.B. Sporn, and A.S. Fauci. 1986. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 163:1037-1050.
- 25 Koenen, H.J., R.L. Smeets, P.M. Vink, E. van Rijssen, A.M. Boots, and I. Joosten. 2008. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112:2340-2352.
- Krummel, M.F., and J.P. Allison. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182:459-465.
- Krummel, M.F., and J.P. Allison. 1996. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* 183:2533-2540.
- 30 Lenschow, D.J., S.C. Ho, H. Sattar, L. Rhee, G. Gray, N. Nabavi, K.C. Herold, and J.A. Bluestone. 1995. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* 181:1145-1155.
- Linsley, P.S., and P. Golstein. 1996. Lymphocyte activation: T-cell regulation by CTLA-4. *Curr Biol* 6:398-400.
- 35 Linsley, P.S., J.L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J.A. Ledbetter, and R. Peach. 1994. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1:793-801.
- Marie, J.C., J.J. Letterio, M. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201: 1061-1067.
- 40 Masteller, E.L., M.R. Warner, Q. Tang, K.V. Tarbell, H. McDevitt, and J.A. Bluestone. 2005. Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from nonobese diabetic mice. *J Immunol* 175:3053-3059.
- McDevitt, H., S. Singer, and R. Tisch. 1996. The role of MHC class II genes in susceptibility and resistance to type I diabetes mellitus in the NOD mouse. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 28:287-288.
- 45 Murai, M., O. Turovskaya, G. Kim, R. Madan, C.L. Karp, H. Cheroutre, and M. Kronenberg. 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 10:1178-1184.
- Nishio, J., M. Feuerer, J. Wong, D. Mathis, and C. Benoist. 2010. Anti-CD3 therapy permits regulatory T cells to surmount T cell receptor-specified peripheral niche constraints. *J Exp Med* 207:1879-1889.

- Ohata, J., T. Miura, T.A. Johnson, S. Hori, S.F. Ziegler, and H. Kohsaka. 2007. Enhanced efficacy of regulatory T cell transfer against increasing resistance, by elevated Foxp3 expression induced in arthritic murine hosts. *Arthritis Rheum* 56:2947-2956.
- 5 Onodera, T., M.H. Jang, Z. Guo, M. Yamasaki, T. Hirata, Z. Bai, N.M. Tsuji, D. Nagakubo, O. Yoshie, S. Sakaguchi, O. Takikawa, and M. Miyasaka. 2009. Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions. *J Immunol* 183:5608-5614.
- Paterson, A.M., and A.H. Sharpe. 2010. Taming tissue-specific T cells: CTLA-4 reins in self-reactive T cells. *Nat Immunol* 11:109-111.
- 10 Pentcheva-Hoang, T., J.G. Egen, K. Wojnoonski, and J.P. Allison. 2004. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21:401-413.
- Pontow, S.E., V. Kery, and P.D. Stahl. 1992. Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 137B:221-244.
- Qu, H.Q., J.P. Bradfield, S.F. Grant, H. Hakonarson, and C. Polychronakos. 2009. Remapping the type I diabetes association of the CTLA4 locus. *Genes and immunity* 10 Suppl 1:527-32.
- 15 Riley, J.L., C.H. June, and B.R. Blazar. 2009. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity* 30:656-665.
- Roncarolo, M.G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M.K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28-50.
- Roopenian, D.C., and S. Akilesh. 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7:715-725.
- 20 Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
- Salomon, B., D.J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J.A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.
- 25 Shoda, L.K., D.L. Young, S. Ramanujan, C.C. Whiting, M.A. Atkinson, J.A. Bluestone, G.S. Eisenbarth, D. Mathis, A.A. Rossini, S.E. Campbell, R. Kahn, and H.T. Kruwel. 2005. A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity* 23:115-126.
- Simon, G., M. Parker, V. Ramiya, C. Wasserfall, Y. Huang, D. Bresson, R.F. Schwartz, M. Campbell-Thompson, L. Tenace, T. Brusko, S. Xue, A. Scaria, M. Lukason, S. Eisenbeis, J. Williams, M. Clare-Salzler, D. Schatz, B. Kaplan, M. Von Herrath, K. Womer, and M.A. Atkinson. 2008. Murine antithymocyte globulin therapy alters disease progression in NOD mice by a time-dependent induction of immunoregulation. *Diabetes* 57:405-414.
- 30 Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
- Tang, Q., J.A. Bluestone, and S.M. Kang. 2012. CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell therapy in transplantation. *Journal of molecular cell biology* 4:11-21.
- 35 Tang, Q., K.J. Henriksen, M. Bi, E.B. Finger, G. Szot, J. Ye, E.L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi, and J.A. Bluestone. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199:1455-1465.
- Tang, Q., K.J. Henriksen, E.K. Boden, A.J. Tooley, J. Ye, S.K. Subudhi, X.X. Zheng, T.B. Strom, and J.A. Bluestone. 2003. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 171:3348-3352.
- 40 Tarbell, K.V., L. Petit, X. Zuo, P. Toy, X. Luo, A. Mqadmi, H. Yang, M. Suthanthiran, S. Mojsov, and R.M. Steinman. 2007. Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med* 204:191-201.
- 45 Taylor, P.A., C.J. Lees, and B.R. Blazar. 2002. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 99:3493-3499.
- Tivol, E.A., F. Borriello, A.N. Schweitzer, W.P. Lynch, J.A. Bluestone, and A.H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541-547.

- Tsunawaki, S., M. Sporn, A. Ding, and C. Nathan. 1988. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 334:260-262.
- 5 Ueda, H., J.M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D.B. Rainbow, K.M. Hunter, A.N. Smith, G. Di Genova, M.H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R.C. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H.E. Rance, V. Everett, L.J. Smink, A.C. Lam, H.J. Cordell, N.M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J.F. Hess, M.L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadia, R. Nithiyanathan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K.M. Gillespie, D.E. Undlien, K.S. Ronningen, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D.A. Savage, A.P. Maxwell, D.J. Carson, C.C. Patterson, J.A. Franklyn, D.G. Clayton, L.B. Peterson, L.S. Wicker, J.A. Todd, and S.C. Gough. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423:506-511.
- 10 Vergani, A., F. D'Addio, M. Jurewicz, A. Petrelli, T. Watanabe, K. Liu, K. Law, C. Schuetz, M. Carvello, E. Orsenigo, S. Deng, S.J. Rodig, J.M. Ansari, C. Staudacher, R. Abdi, J. Williams, J. Markmann, M. Atkinson, M.H. Sayegh, and P. Fiorina. 2010. A novel clinically relevant strategy to abrogate autoimmunity and regulate alloimmunity in NOD mice. *Diabetes* 59:2253-2264.
- 15 Wahl, S.M., N. McCartney-Francis, J.B. Allen, E.B. Dougherty, and S.F. Dougherty. 1990. Macrophage production of TGF-beta and regulation by TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci* 593:188-196.
- Walunas, T.L., C.Y. Bakker, and J.A. Bluestone. 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 183:2541-2550.
- 20 Walunas, T.L., and J.A. Bluestone. 1998. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J Immunol* 160:3855-3860.
- Walunas, T.L., D.J. Lenschow, C.Y. Bakker, P.S. Linsley, G.J. Freeman, J.M. Green, C.B. Thompson, and J.A. Bluestone. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405-413.
- Waterhouse, P., J.M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K.P. Lee, C.B. Thompson, H. Griesser, and T.W. Mak. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science* 270:985-988.
- 25 Weigel, P.H. 1994. Galactosyl and N-acetylgalactosaminyl homeostasis: a function for mammalian asialoglycoprotein receptors. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 16:519-524.
- Wicker, L.S., J.A. Todd, and L.B. Peterson. 1995. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* 13:179-200.
- 30 Yamagiwa, S., J.D. Gray, S. Hashimoto, and D.A. Horwitz. 2001. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 166:7282-7289.
- Zhao, D., C. Zhang, T. Yi, C.L. Lin, I. Todorov, F. Kandeel, S. Forman, and D. Zeng. 2008. In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease. *Blood* 112:2129-2138.
- Zheng, S.G., J.D. Gray, K. Ohtsuka, S. Yamagiwa, and D.A. Horwitz. 2002. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol* 169:4183-4189.
- 35 Zhou, X., S. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, and J.A. Bluestone. 2009a. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr Opin Immunol* 21:281-285.
- Zhou, X., S.L. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martinez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J.A. Bluestone. 2009b. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* 10:1000-1007.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión biespecífica que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC, en donde el ligando específico para CTLA-4 y el ligando específico para el complejo pMHC están separados por un conector.
- 5 2. Una proteína de fusión biespecífica según la reivindicación 1, en donde el ligando específico para CTLA-4 se selecciona de CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2), o un anticuerpo específico para CTLA-4.
3. Una proteína de fusión biespecífica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el ligando específico para el complejo pMHC se selecciona de un anticuerpo anti-MHC y LAG-3.
- 10 4. Una proteína de fusión biespecífica según cualquier reivindicación precedente, en donde el conector es uno o más de una secuencia de poliaminoácido y un dominio Fc de anticuerpo.
5. Una proteína de fusión biespecífica según la reivindicación 4, en donde la secuencia de poliaminoácido es G9 (Gly-9).
6. Una proteína de fusión biespecífica según la reivindicación 2, en donde el ligando específico para CTLA-4 es CD80, preferiblemente un CD80 mutado para aumentar la especificidad por CTLA-4.
- 15 7. Una proteína de fusión biespecífica según la reivindicación 6, en donde CD80 es CD80 humano que comprende al menos una de las mutaciones W84A, K71G, K71V, S109G, R123S, R123D, G124L, S190A, S201A, R63A, M81A, N97A y E196A, preferiblemente W84A o E196A.
8. Una proteína de fusión biespecífica según la reivindicación 3, en donde el ligando específico para el complejo pMHC es LAG-3, preferiblemente mutado para aumentar la especificidad por pMHCII.
- 20 9. Una proteína de fusión biespecífica según la reivindicación 8, en donde LAG-3 es LAG-3 humano que comprende al menos una de las mutaciones R73E, R75A, R75E y R76E, preferiblemente R75A o R75E.
10. Una proteína de fusión biespecífica según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la proteína de fusión comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 14.
- 25 11. La proteína de fusión biespecífica según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para usar en la inducción de inmunotolerancia de una célula T, cuando la célula T se pone en contacto con una célula que presenta un antígeno la cual presenta un antígeno por medio de una molécula MHC y la proteína de fusión biespecífica.
12. La proteína de fusión biespecífica según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad autoinmune y rechazo al trasplante.
- 30 13. La proteína de fusión biespecífica para usar según la reivindicación 12, en donde la proteína de fusión biespecífica se administra en combinación con un supresor o modulador inmunológico.
14. La proteína de fusión biespecífica para usar según la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona de diabetes tipo 1 (DT1), lupus eritomatoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), enfermedad intestinal inflamatoria (EII), colitis ulcerosa (CU), enfermedad de Crohn (EC), esclerosis múltiple (EM), escleroderma, pénfigo vulgar (PV), soriasis, dermatitis atópica, enfermedad celíaca, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves (tiroides), síndrome de Sjögren, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Addison, granulomatosis de Wegener, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmune, polimialgia reumática, fenómeno de Raynaud, arteritis temporal, arteritis de células gigantes, anemia hemolítica autoinmune, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, enfermedad de Behçet, cirrosis biliar primaria, uveítis, miocarditis, fiebre reumática, espondilitis anquilosante, glomerulonefritis, sarcoidosis, dermatomiositis, miastenia grave, polimiositis, alopecia areata y vitíligo.
- 40 15. La proteína de fusión biespecífica para usar según la reivindicación 14, en donde la enfermedad autoinmune es diabetes tipo 1 (DT1).

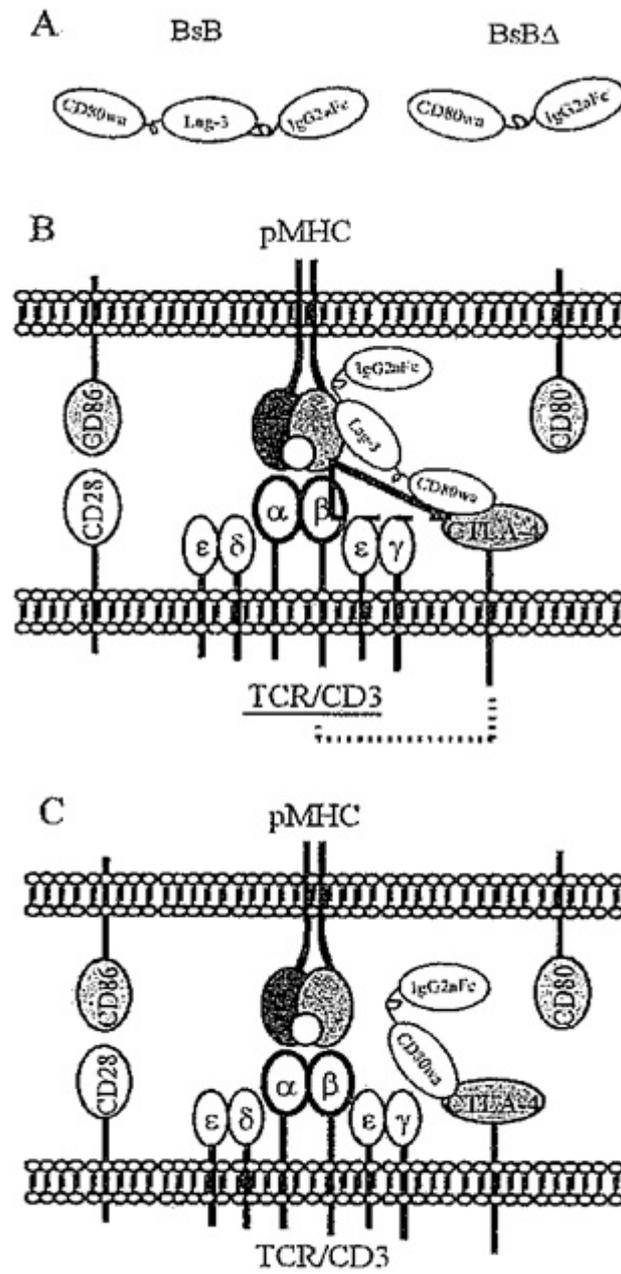


Figura 1

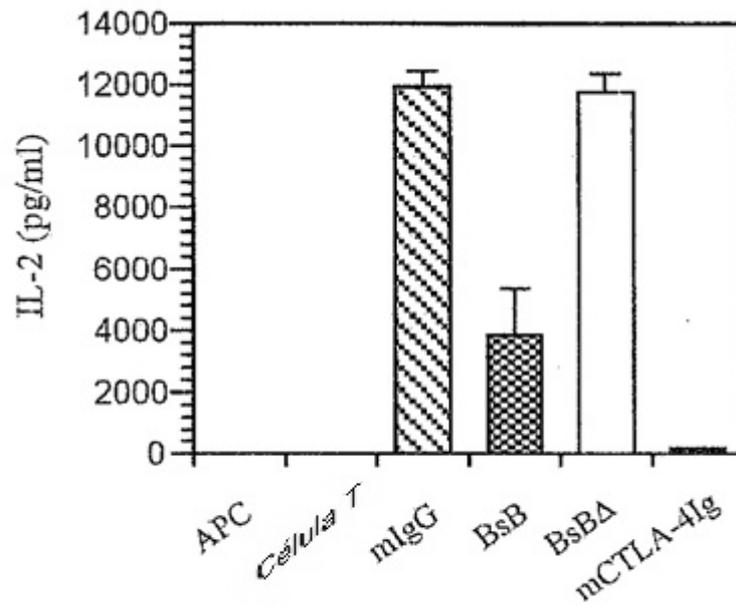
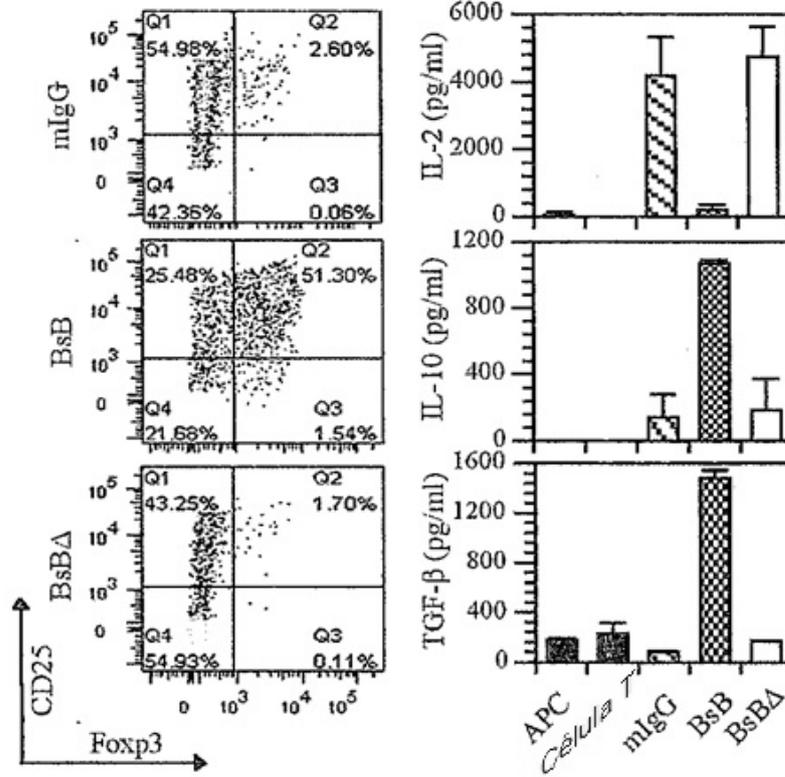


Figura 2

A



B

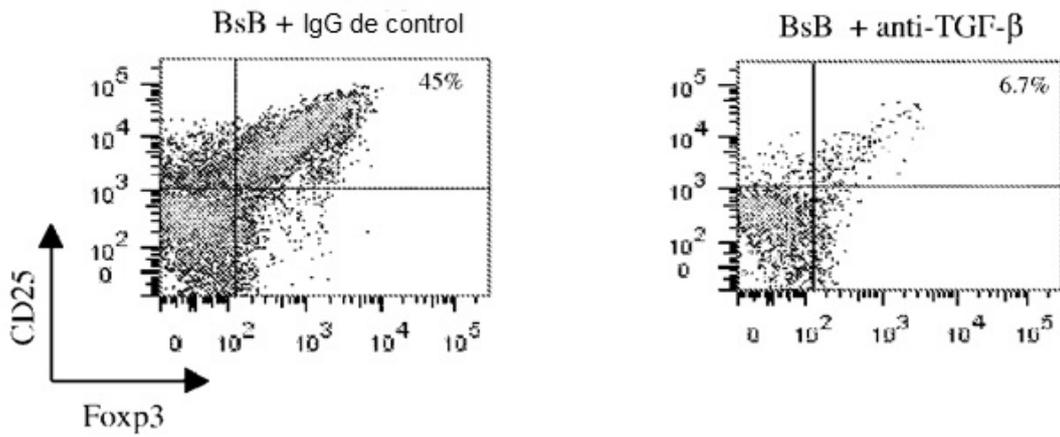


Figura 3

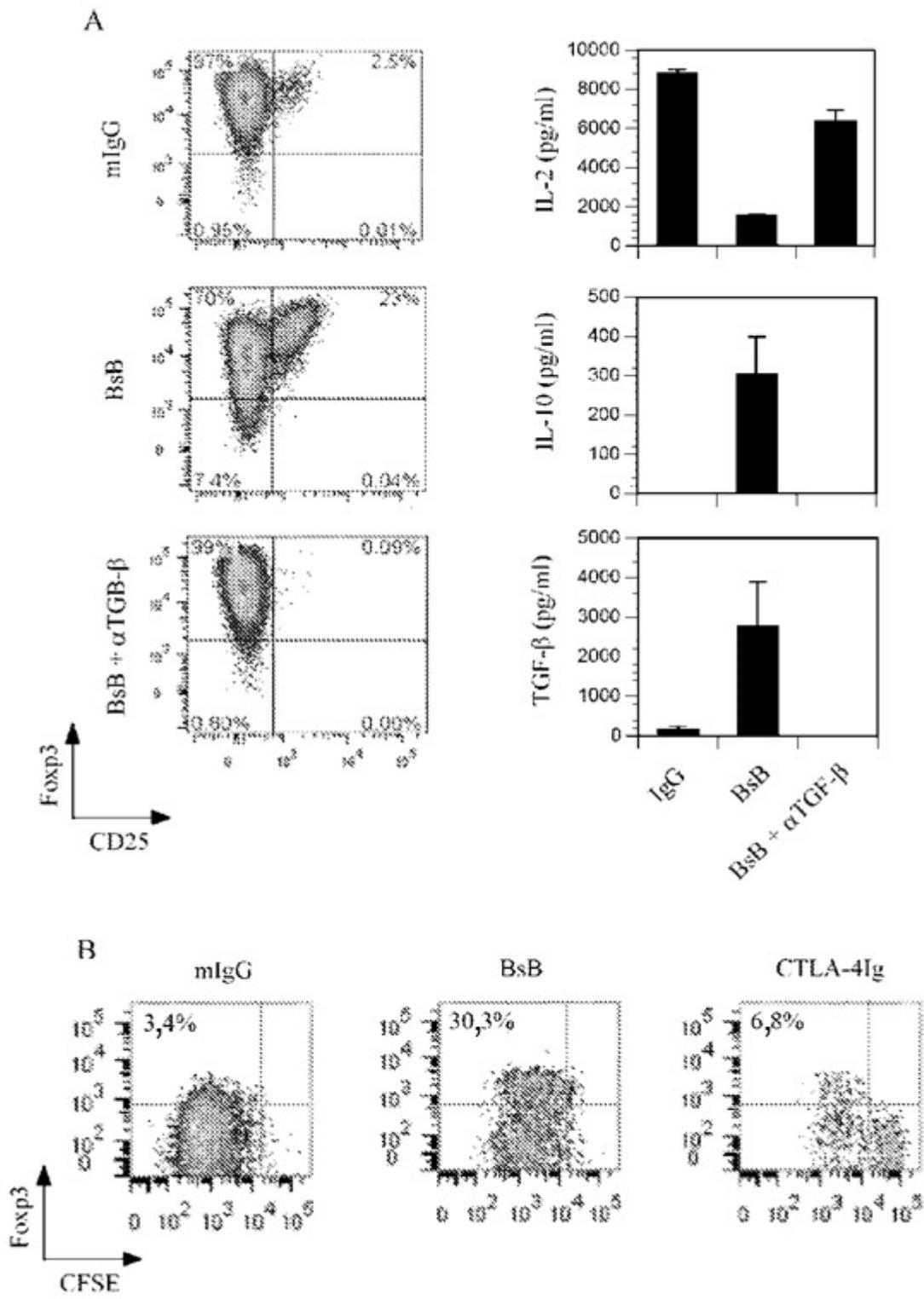


Figura 4

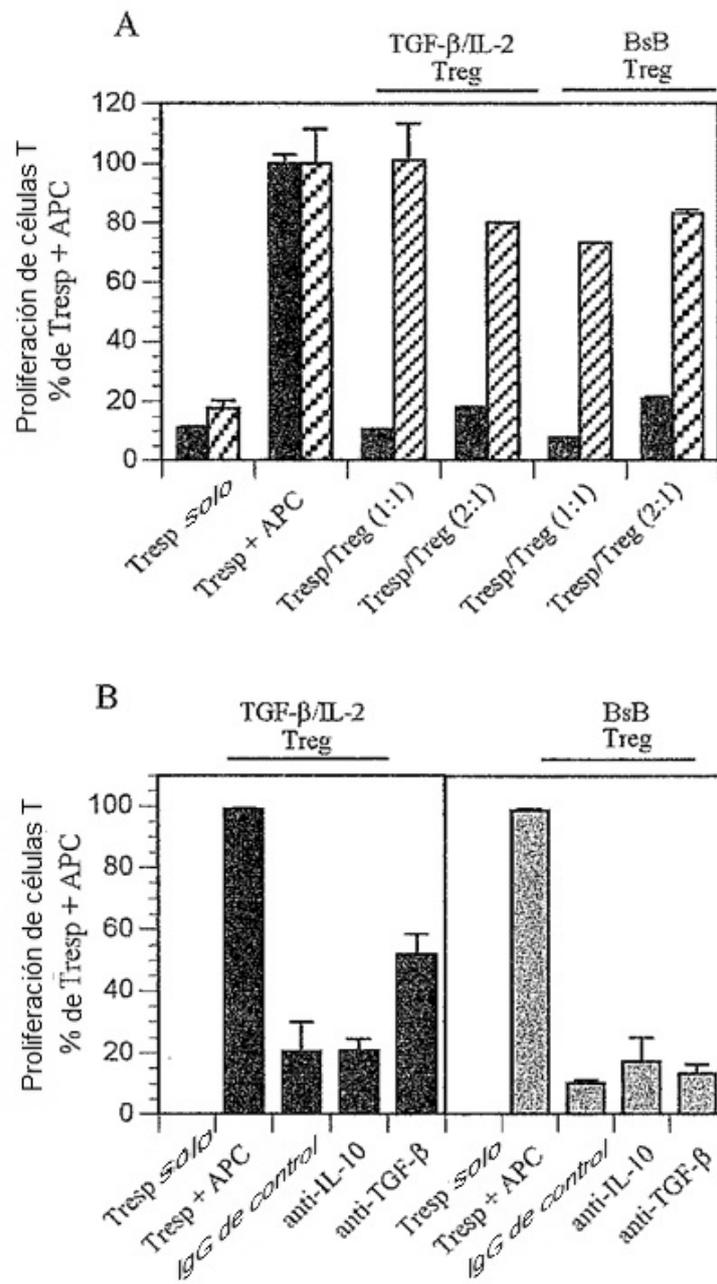


Figura 5

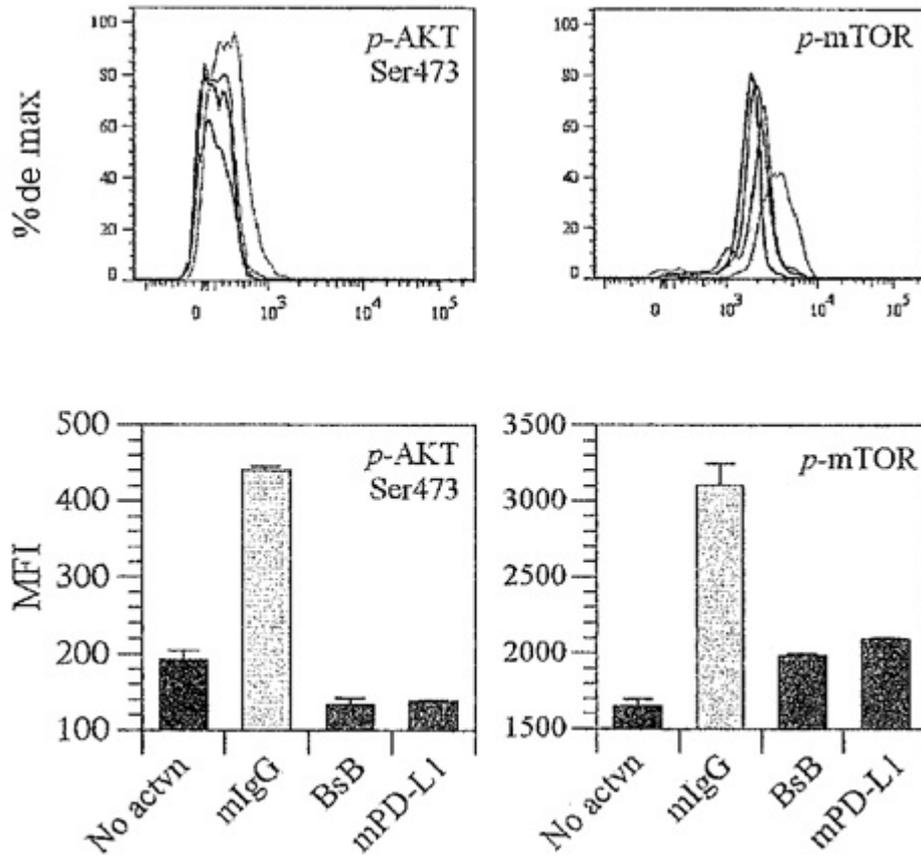


Figura 6

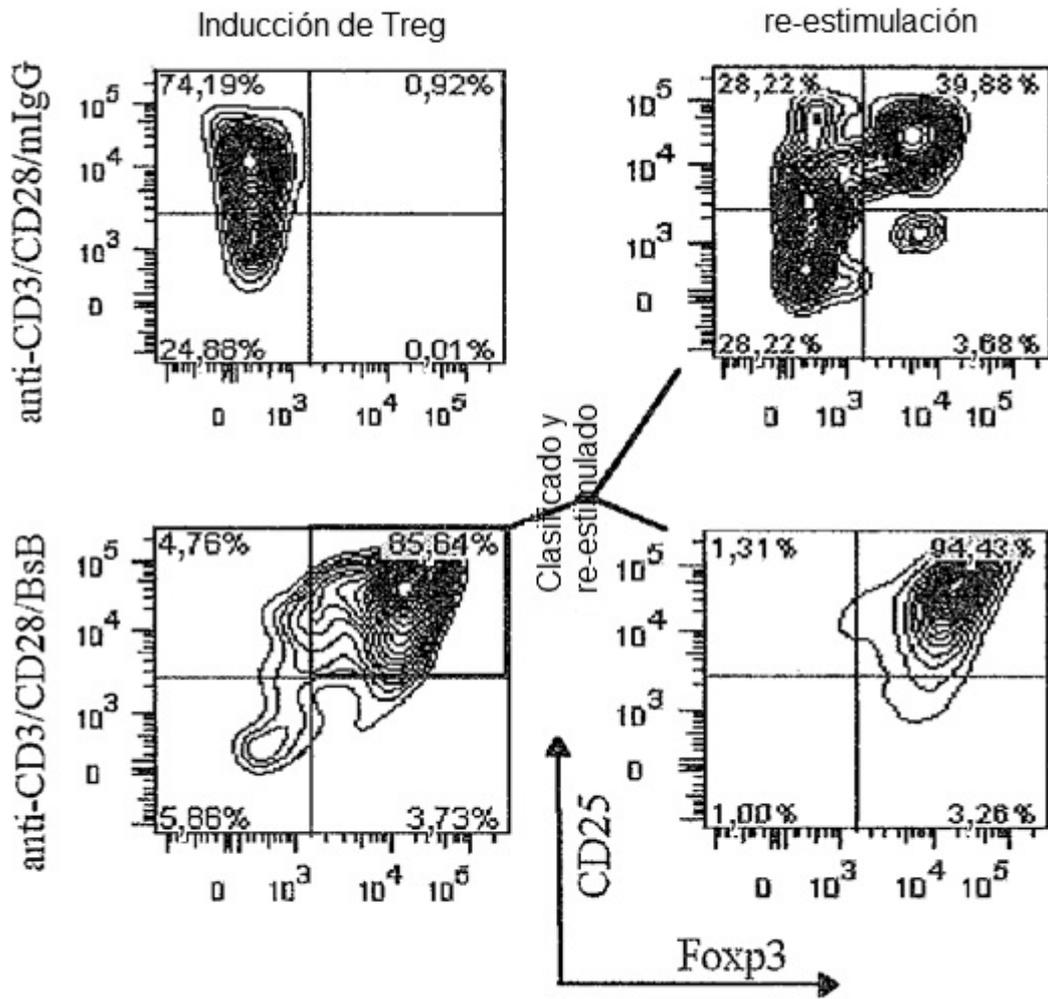


Figura 7

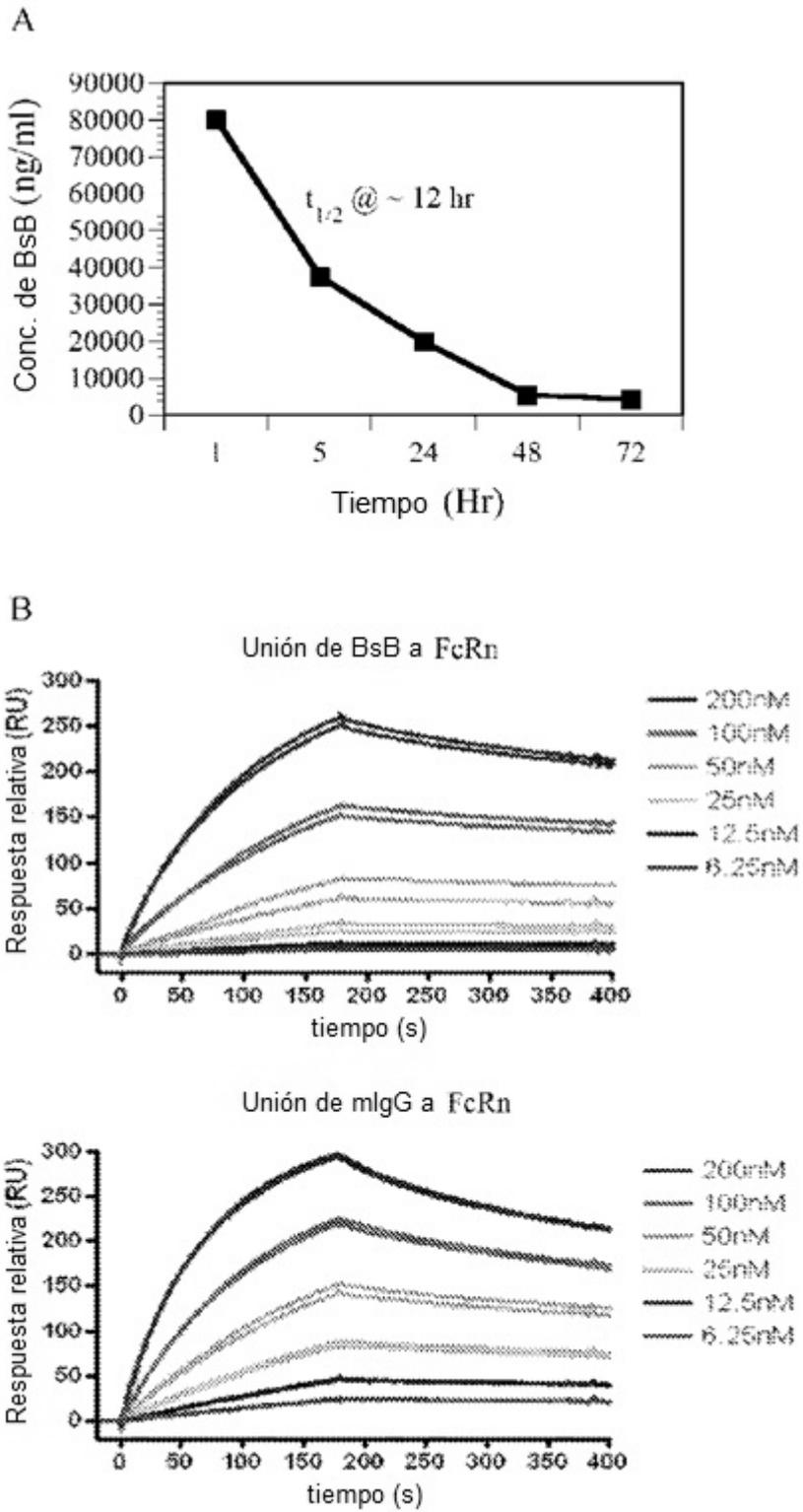


Figura 8

.....
 N. N. N. N.
 N. N.

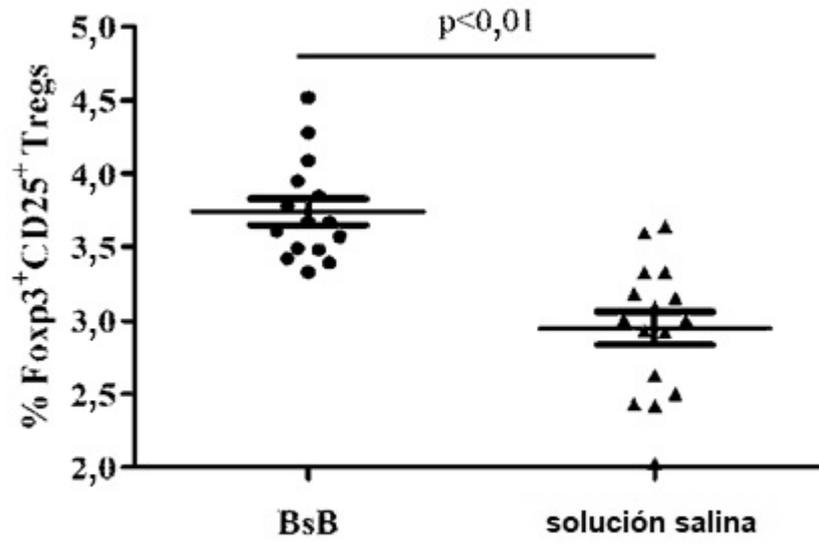
 N. N.

 N.

Azúcares/BsB	Fuc	GlcNAc	Gal	Man	Ácido siálico	Relación ácido siálico/Gal
Mol/Mol	8,0 ± 0,6	37,1 ± 2,2	28,5 ± 1,1	36,8 ± 2,6	19,3 ± 0,7	0,68

Figura 9

A



B

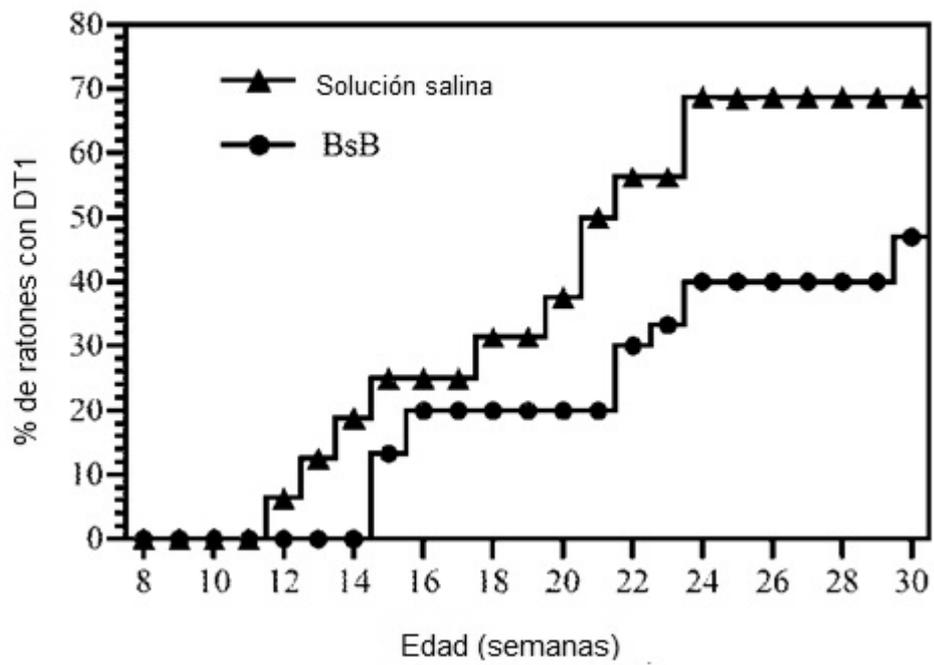
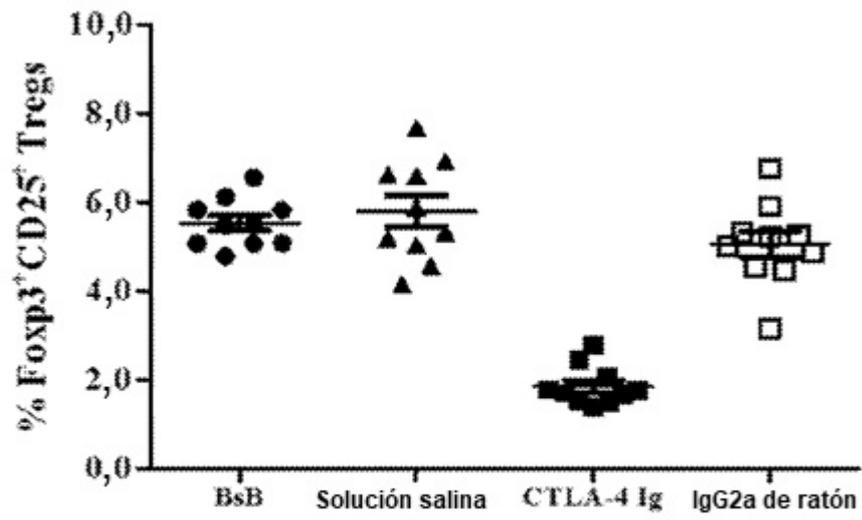


Figura 10

A



B

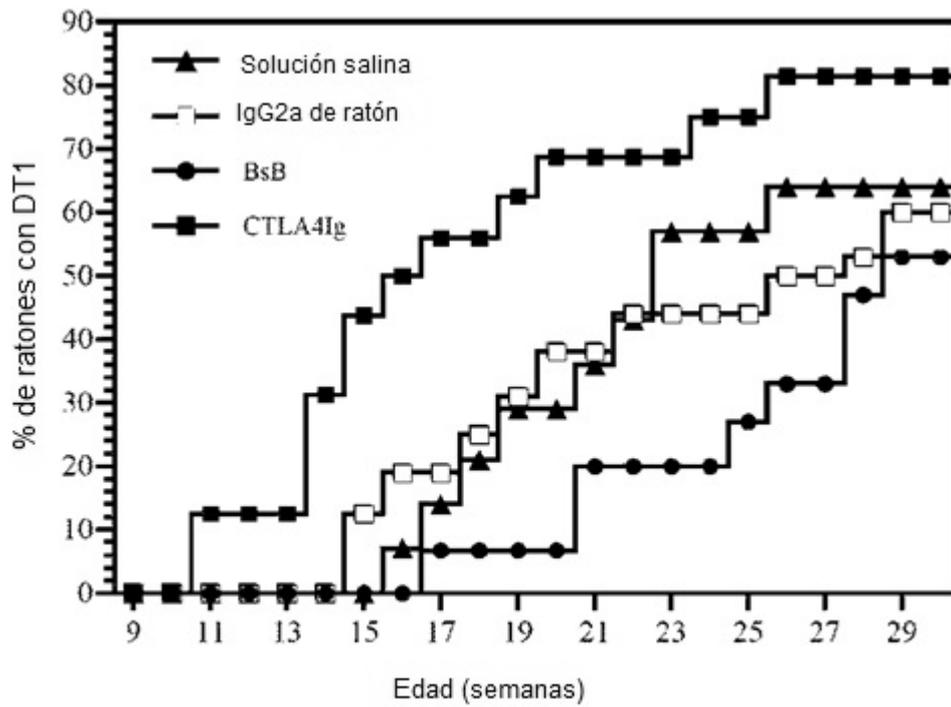


Figura 11

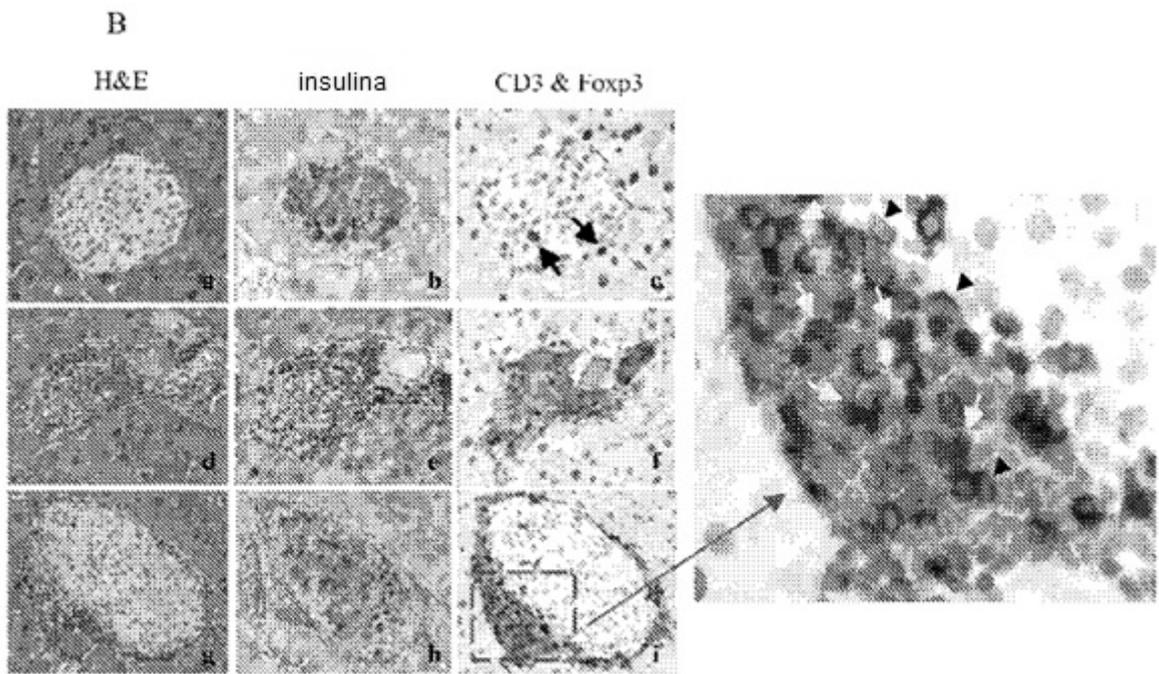
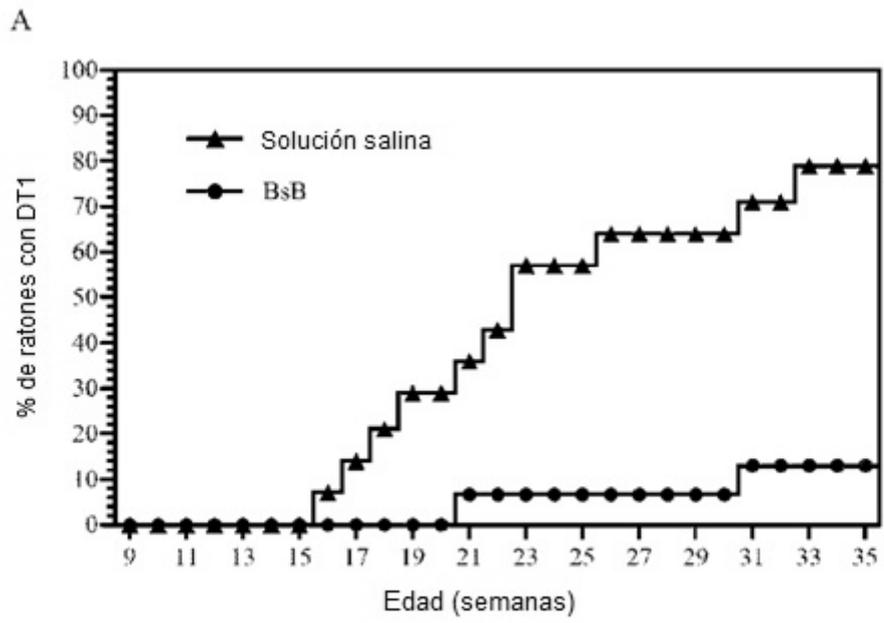


Figura 12