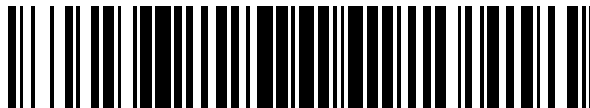


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 777 778**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/705** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2013** **E 17163638 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019** **EP 3207938**

54 Título: **Variantes de CTLA-4**

30 Prioridad:

**11.05.2012 US 201261645686 P**

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

**06.08.2020**

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)  
Milstein Building Granta Park  
Cambridge CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**MINTER, RALPH;  
DOUTHWAITE, JULIE;  
MOISAN, JACQUES;  
BOWEN, MICHAEL;  
RUST, STEVEN y  
PRIVSENTZEV, CYRIL**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 777 778 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

Variantes de CTLA-4

Campo

5 Esta presente divulgación se refiere a composiciones que comprenden variantes del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4, por sus siglas en inglés), fusionado opcionalmente con la región Fc de IgG, y su uso terapéutico para inhibir la activación de los linfocitos T, especialmente en el contexto de condiciones inflamatorias tales como la artritis reumatoide (RA, por sus siglas en inglés).

Antecedentes

10 Se cree que la activación de los linfocitos T vírgenes procede por un mecanismo de dos señales. Tras encontrarse con una célula presentadora de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), el receptor de linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) interactúa con péptidos en el contexto de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) y, por lo tanto, proporciona la primera señal de activación a los linfocitos T. Esta señal inicial es insuficiente para conducir a la activación de los linfocitos T y una segunda señal procedente de los receptores coestimuladores constituye un requisito absoluto. Uno de los receptores coestimuladores más importantes y mejor descritos es el CD28 que interacciona con CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2) en la superficie de los macrófagos, células dendríticas así como también linfocitos T activados y B.

15 El gen CD86 codifica una proteína de membrana de tipo I (N.º de ac. Swiss-Prot P33681). El corte y empalme alternativo da como resultado dos variantes transcripcionales del gen CD86 que codifican diferentes isoformas. Se han descrito variantes transcripcionales adicionales, pero no se han determinado sus secuencias completas.

20 La proteína relacionada CD80 (N.º ac. Swiss-Prot P42081) tiene una estructura secundaria similar a CD86. CD80 comparte un 26% y un 46% de residuos aminoacídicos idénticos y similares con CD86, respectivamente. CD80 se expresa únicamente con niveles bajos en APC en reposo pero pueden elevarse de manera regulada tras la activación. CD80 reconoce los mismos receptores en los linfocitos T, CD28 y CD152 (CTLA-4), pero se une a este último con una afinidad de aproximadamente 2 a 4 veces mayor que la que tiene CD86.

25 No se ha identificado ningún epítipo peptídico lineal compartido que sea responsable de la unión a CD28 y/o CTLA-4 (Ellis *et al.*, *J Immunol.*, 156, 2700-2709) pero se han detectado residuos conservados en las estructuras secundarias (láminas IgV de CD80 y CD86) en la interacción con CTLA-4 (Swartz *et al.*, *Nature*, 410, 604-608).

30 La transducción de señales desde CD28 conduce a la activación de linfocitos T y al aumento regulado del receptor coinhibidor CTLA-4. El CTLA-4 es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. Se une a CD80 y CD86 con una mayor afinidad y avidéz en comparación con CD28 y hace descender eficazmente de manera regulada las señales de activación.

Se han postulado varias teorías sobre las funciones relativas de CD80 y CD86 en la unión con CTLA-4. Slavik *et al.* (*Immunol. Res.* 19(1):1-24 1999) revisaron la señalización y función de las familias CD28/CTLA-4 y CD80/CD86. Sansom (*Immunology* 101:169-177 2000) resumió algunos estudios donde se investigaron las diferencias entre CD80 y CD86.

35 Odobasic *et al.* (*Immunology* 124:503-513 2008) investigó las funciones de CD80 y CD86 en las respuestas de linfocitos T efectoras. Este estudio investigó los efectos de los anticuerpos anti-CD80 y anti-CD86 monoclonales en un modelo en ratones inducido por el antígeno de la artritis. Se publicó que el bloqueo de CD80 y CD86 daba lugar a una tendencia hacia una reducción de la gravedad de la enfermedad en comparación con los ratones tratados con anticuerpos de control. Basándose en los resultados del tratamiento con los anticuerpos individuales, los autores concluyeron que CD80 exacerba la artritis al hacer descender de manera regulada la IL-4 sistémica y al aumentar la acumulación en las articulaciones de linfocitos T, a la vez que CD86 acentúa la gravedad de la enfermedad al aumentar de manera regulada la IL-17 y aumentar la acumulación de los linfocitos T efectoras en las articulaciones sin afectar al desarrollo de Th1 o Th2. Sin embargo, el estudio señala que no se observó una reducción aditiva adicional en la gravedad de la artritis cuando se bloquearon CD80 y CD86, lo que sugiere que la inhibición de cualquiera de las moléculas coestimuladoras era adecuada para obtener una mejora de la enfermedad máxima. Este modelo se basó en una respuesta de recuerdo contra el antígeno (BSA en este estudio) inyectado directamente en el espacio de la articulación.

Otro estudio utilizó un modelo murino de artritis inducido por colágeno, que conlleva suprimir la tolerancia a un antígeno endógeno (colágeno). En este estudio, se señaló que se requería el bloqueo de CD80 y CD86 para el máximo beneficio (Webb *et al.* *Eur J. Immunol* 26(10):2320-2328 1996).

50 Se ha mostrado que una proteína de fusión recombinante que comprende el dominio extracelular de CTLA-4 unido a un dominio Fc de IgG1 modificado ("CTLA-4 - Ig") se une a CD80 y CD86 *in vivo* y suprime eficazmente la activación de linfocitos T mediada por CD28 (Kliwinski *et al.*, *J Autoimmun.* 2005; 25(3):165-71).

Se han desarrollado proteínas de fusión de CTLA-4 como agentes terapéuticos para la artritis reumatoide (RA), por sus siglas en inglés. La RA es una enfermedad degenerativa progresiva que conduce a la destrucción de cartílago y hueso.

Se dispone de evidencia de que muchas ramas del sistema inmunitario están implicadas en el proceso inflamatorio que conduce a sinoviocitos de tipo fibroblasto y daño articular y destrucción de cartílago y hueso mediados por osteoclastos. Múltiples estudios han mostrado un aumento en la activación de linfocitos T en la cápsula sinovial y hasta un 50% de las células que se infiltran en el tejido sinovial inflamado son linfocitos T. Además, los linfocitos T de la cápsula sinovial de

5

pacientes con RA exhiben un fenotipo efector activado y muestran un aumento de la expresión de marcadores asociados a la activación tales como CD44, CD69, CD45RO, VLA-1 y CD27.

Se ha demostrado que los linfocitos T activados desempeñan una función crucial en el establecimiento y mantenimiento de la respuesta inflamatoria patológica observada en la cápsula sinovial de la RA. Los linfocitos T activados son una fuente importante de citocinas proinflamatorias tales como IFN $\gamma$ , IL-17 y TNF $\alpha$ . Estos factores son activadores potentes de los sinoviocitos de tipo fibroblasto (FLS, por sus siglas en inglés) y sinoviocitos de tipo macrófago (MLS, por sus siglas en inglés) que conducen a la secreción de metaloproteinasas de la matriz (MMP, por sus siglas en inglés) que son mediadoras de la destrucción de cartílago así como de la secreción de mediadores inflamatorios tales como IL-6, IL-1 y TNF $\alpha$ . Las células CD4+ activadas también pueden proporcionar ayuda cognada a los linfocitos B que conduce a la producción de anticuerpos, tales como el factor reumatoide (RF, por sus siglas en inglés) que además contribuyen a la evolución de la enfermedad.

10

15

Abatacept (Orencia®) es una proteína de fusión CTLA-4 Ig que contiene el dominio extracelular de CTLA-4 fusionado con la región Fc de IgG1. La proteína soluble resultante es un dímero con un peso molecular de aproximadamente 92 kDa. Se ha demostrado que tiene efectos beneficiosos en el tratamiento de pacientes con RA en el consultorio, lo que demuestra que la inhibición de la ruta de la coestimulación en la que participan CD80 y CD86 es una estrategia terapéutica viable para la RA. La terapia de la RA con Abatacept se administra ya sea como una inyección intravenosa mensual o una inyección subcutánea semanal.

20

El Abatacept contiene en su bucle de tipo CDR3 el motivo hexapeptídico de aminoácido MYPPPY, el cual comparten CD28 y CTLA-4 y del que se ha señalado que es necesario para la unión a los ligandos B7. La mutación de la primera tirosina (Y) de este motivo en alanina (A) anula la unión a CD80, pero también provoca una unión reducida a CD86, mientras que una sustitución con fenilalanina (F) permite retener la afinidad por CD80 al completo con una pérdida total de la unión a CD86 (Harris *et al.*, *J. Exp. Med.* (1997) 185:177-182). También son importantes otros residuos en las regiones de tipo CDR3 y CDR1 para la interacción de Abatacept con sus ligandos. Por lo tanto, una molécula mutante con ácido glutámico (E) en lugar de leucina (L) en la posición 104 y tirosina (Y) en lugar de alanina (A) en la posición 29 exhibe una avidez de unión por CD80 (B7-1) aproximadamente 2 veces mayor y una avidez de unión por CD-86 (B7-2) aproximadamente 4 veces mayor que Abatacept. Se ha señalado que el compuesto LEA-29Y (Belatacept, Nulojix®) tiene una afinidad similar para unirse a CD80 que para unirse a CD86 (3.66 nM y 3.21 nM respectivamente). Belatacept ha sido desarrollado como un inmunosupresor para trasplantes (Larsen *et al.*, *Am. J. Transplantation* (2005) 5:443-453; Gupta y Womer, *Drug Des Develop Ther* 4:375-382 2010) y recientemente se ha aprobado para la profilaxis del rechazo de órganos en pacientes adultos que reciben un trasplante de riñón. El propio Abatacept ha mostrado una eficacia limitada contra el rechazo del trasplante, un descubrimiento que se ha atribuido a su menor inhibición de la coestimulación dependiente de CD86 a diferencia de la coestimulación dependiente de CD80 (Gupta y Womer, *supra*).

25

30

35

Las formulaciones de Abatacept y Belatacept para la administración subcutánea se describen en WO2007/07654.

Se han realizado previamente selecciones para conseguir una afinidad y estabilidad mejoradas utilizando la presentación de ribosomas para aislar las variantes mejoradas de CTLA-4. Tanto la mutagénesis por PCR propensa a errores, para mutar la secuencia genética al completo, como la mutagénesis dirigida, para conseguir mutaciones en regiones clave, han tenido éxito en la evolución de proteínas. Por ejemplo, en WO2008/047150 se publicó que variantes proteicas de CTLA-4 mostraban una mayor actividad y una mayor estabilidad en comparación con el tipo natural.

40

Maxygen, Inc. publicó que una molécula terapéutica CTLA-4-Ig, denominada ASP2408, está siendo desarrollada por Perseid Therapeutics LLC en colaboración con Astellas Pharma Inc para el tratamiento de la RA. Se ha publicado que CTLA-4-Ig muestra una potencia mejorada en comparación con Orencia® (Abatacept) (WO2009/058564).

45

En US 6.750.334 (Repligen Corporation) se describió CTLA-4-C $\gamma$ 4, una proteína de fusión soluble que comprende CTLA-4 fusionado con una porción de una inmunoglobulina. La región constante de la inmunoglobulina, que comprende una región bisagra y dominios CH2 y CH3, se modifica por sustitución, adición o eliminación de al menos un residuo aminoacídico para reducir la activación del complemento o la interacción con el receptor de la región Fc.

50

Xencor, Inc. describió recientemente una molécula de CTLA4-Ig que comprende una porción de una variante de CTLA-4 y una región Fc de una inmunoglobulina (WO2011/103584). Se describieron varias sustituciones aminoacídicas en la secuencia de aminoácidos de la porción CTLA-4 para generar variantes de CTLA4-Ig con una mayor actividad inhibitoria de los linfocitos T. WO2011/103584 también describe modificaciones de Fc, por ejemplo, para mejorar la unión a Fc $\gamma$ R, lo que mejora las funciones efectoras mediadas por la región Fc y/o prolonga la semivida *in vivo* de la CTLA4-Ig.

55

WO 2011/113019 divulga polipéptidos de CTLA-4 variantes y sus proteínas de fusión y su uso en la terapia de seres humanos.

Compendio de la presente divulgación

## ES 2 777 778 T3

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona polipéptidos de CTLA-4 que son variantes del CTLA-4 del tipo natural. Los polipéptidos de CTLA-4 de la presente divulgación pueden tener una o más propiedades mejoradas, tales como una mayor potencia, una mayor afinidad por CD80 y/o CD86, una selectividad potenciada por CD80 respecto CD86, una buena reactividad cruzada y/o una estabilidad mayor que la del tipo natural.

5 Se pueden conseguir mejoras en CTLA-4 mutando la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CTLA-4 humano de tipo natural humano, también conocido como CTLA-4 soluble. Se pueden introducir una o más mutaciones de aminoácidos, que pueden ser una sustitución, inserción o eliminación de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de CTLA-4 para producir un polipéptido de CTLA-4 mejorado tal como se describe en la presente. El polipéptido puede, por ejemplo, exhibir una mayor potencia, afinidad y/o estabilidad respecto al CTLA-4 de tipo natural.

10 El dominio extracelular de CTLA-4 comprende la secuencia de aminoácidos de tipo natural SEQ ID NO: 35. La SEQ ID NO: 35 no es el dominio extracelular completo, pero es la región empleada en Abatacept (Orencia®).

Los polipéptidos de CTLA-4 de la presente divulgación pueden o no comprender residuos o secuencias de CTLA-4 adicionales más allá de la región correspondiente a la SEQ ID NO: 35. Preferentemente, el polipéptido de CTLA-4 de la presente divulgación es soluble. Por lo tanto, generalmente no comprendería la región transmembrana de CTLA-4.

15 En la presente se identifican varias mutaciones comprendidas en la secuencia de aminoácidos de CTLA-4, que se asocian con una mejor potencia, afinidad y/o estabilidad o que se pueden introducir con otros propósitos tales como para influenciar la dimerización.

Algunos ejemplos de sustituciones de aminoácidos en el CTLA-4 de tipo natural son: R, S, V o T en I16; T en A24; N o P en S25; S en G27; I en V 32; G en D41; G en S42; E en V44; K o V en M54; S o G en N56; A, G, S o P en L58; S o A en T59; T en F 60; Q o P en L61; G en D 62; Y en D63; P en S 64; N, D, V o T en I65; A, T, M o H en S70; R en Q80; Q, S, V, R, K o L en M85; S en T87; Q, H, T, E o M en K93; R, Q o E en L104; V en I106; D o S en N108; V o F en I115 y S en C120. Un ejemplo de una eliminación de aminoácidos es la eliminación de T51. La numeración de residuos se hace en referencia a las secuencias CTLA-4 que se muestran en la Figura 1A y en la Figura 2, donde el primer residuo se numera como la posición 1 de la "numeración de la secuencia". La Figura 1 también muestra la numeración Swiss Prot para comparar.

Una variante de CTLA-4 puede tener, por ejemplo, hasta doce o hasta 20 mutaciones de aminoácidos en el CTLA-4 soluble de tipo natural humano. Las mutaciones pueden incluir cualquiera de las mutaciones de aminoácidos enumeradas anteriormente o todas ellas y, opcionalmente, una o más mutaciones diferentes, p. ej., sustituciones diferentes en estas u otras posiciones de residuos. Una secuencia de aminoácidos variante puede comprender la secuencia de CTLA-4 de tipo natural humana SEQ ID NO: 35 con una o más, p. ej., al menos cinco, seis o siete de las mutaciones de aminoácidos enumeradas.

Un polipéptido de CTLA-4 puede comprender o estar constituido por una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad secuencial con la SEQ ID NO: 35.

Algunos ejemplos de las secuencias de aminoácidos de la variante de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación incluyen aquellas de las SEQ ID NOS: 36-55 que se muestran en la Figura 1A. Una variante de CTLA-4 puede comprender la secuencia de aminoácidos de CTLA-4 "1299" codificada por el ácido nucleico depositado con el n.º de acceso NCIMB 41948. El n.º de acceso NCIMB 41948 codifica el polipéptido de CTLA-4 1299 fusionado con una región Fc de una inmunoglobulina. El polipéptido de CTLA-4 1299 codificado, la región Fc codificada y el polipéptido codificado que comprende el polipéptido de CTLA-4 1299 fusionado con la región Fc, todos los cuales están codificados por el ácido nucleico depositado con el n.º de acceso NCIMB 41948, son aspectos individuales de la presente divulgación.

Las mutaciones preferidas con sustituciones de aminoácidos seleccionadas a partir de las siguientes: R, S o V en I16; T en A24; N en S25; S en G27; K en M54; S en N56; A o G en L58; S en T59; T en F 60; Q en L61; Y en D63; P en S 64; N o D en I65; A en S70; R en Q80; Q o S en M85; Q o H en K93; y S en C120. En consecuencia, una secuencia de aminoácidos variante puede comprender la secuencia de CTLA-4 de tipo natural humana SEQ ID NO: 35 con uno o más, p. ej., al menos cinco o seis de estas posiciones de residuos de aminoácidos, o todas ellas, sustituidas por diferentes residuos según se especifique.

Una secuencia polipeptídica de CTLA-4 comprende preferentemente: R, I, S o V en la posición 16; T o A en la posición 24; N en la posición 25; S o G en la posición 27; M o K en la posición 54; N o S en la posición 56; A, L o G en la posición 58; T o S en la posición 59; F o T en la posición 60; L o Q en la posición 61; D o Y en la posición 63; S o P en la posición 64; I, N o D en la posición 65; A o S en la posición 70; Q o R en la posición 80; Q, M o S en la posición 85; Q o H en la posición 93; y/o C o S en la posición 120. Otras posiciones de residuos pueden ser de tipo natural humano o pueden estar sujetas a una o más mutaciones adicionales.

Un polipéptido de CTLA-4 puede comprender N en la posición 25, lo que representa una sustitución del S de tipo natural en esta posición. El polipéptido puede comprender Q o H en la posición 93, lo que representa una sustitución del K de tipo natural en esta posición. Tal como se ilustra en los Ejemplos descritos posteriormente, se cree que estas sustituciones en los residuos 25 y 93 están fuertemente asociadas a mejoras en la afinidad, potencia y/o estabilidad de CTLA-4.

Un motivo de aminoácidos preferido, que se observó en múltiples variantes con una elevada potencia, es STQDYPN (SEQ ID NO: 69). Este motivo, ubicado en los residuos 59-65, está en una región bucle que parece estar muy próxima a CD80 y CD86 en la estructura unida. En consecuencia, en ciertos aspectos, un polipéptido de CTLA-4 comprende la SEQ ID NO: 69 en los residuos 59-65. La numeración de los residuos es tal y como se muestra en la Figura 1A (fila superior de numeración, que comienza en 1) y la Figura 2. Cuando están presentes inserciones o eliminaciones, la numeración de residuos real del polipéptido puede variar respecto a la de la secuencia de referencia. La Figura 1A también muestra la numeración Swiss Prot para comparar.

Puede ser también deseable mutar C en la posición 120, p. ej., sustituyéndolo por S, con el fin de evitar que se forme un puente disulfuro entre las moléculas de CTLA-4 en esta ubicación, y para inhibir la dimerización de CTLA-4. En otras situaciones, es deseable retener o promover la dimerización de CTLA-4 o una multimerización superior (p. ej., la formación de un tetrámero). Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la retención de C120 y/o mediante la adición de dominios que dimerizan, tal como conjugando CTLA-4 con una región Fc de IgG. La adición de este tipo de dominios y la formación de macromoléculas que comprenden CTLA-4 se discutirá en más detalle más adelante.

Un polipéptido de CTLA-4 puede comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 68, o puede comprender la SEQ ID NO: 68 con una o más mutaciones. Por ejemplo, un polipéptido de CTLA-4 puede comprender la SEQ ID NO: 68 con hasta doce mutaciones, hasta diez mutaciones de aminoácidos o hasta cinco mutaciones, p. ej., una, dos o tres mutaciones de aminoácidos. La SEQ ID NO: 68 se ilustra en la Figura 2, y es una secuencia consenso de residuos hallada en un grupo de seis polipéptidos de CTLA-4 con una actividad funcional excepcionalmente buena, que se produjeron tal y como se describe en los Ejemplos. Los seis polipéptidos tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en la Figura 1A, con las siguientes SEQ ID NOS: SEQ ID NO: 43 (variante 1299), SEQ ID NO: 37 (variante 1322), SEQ ID NO: 38 (variante 1321), SEQ ID NO: 36 (variante 1315), SEQ ID NO: 42 (variante 1115) y SEQ ID NO: 47 (variante 1227). Estas seis secuencias, y variantes con una o más mutaciones de aminoácidos, por ejemplo, hasta doce, p. ej., hasta diez mutaciones de aminoácidos, p. ej., hasta cinco mutaciones, p. ej., una, dos o tres mutaciones de aminoácidos en cualquiera de estas seis secuencias, representan ejemplos de la presente divulgación. Un polipéptido CTLA-4 puede comprender la secuencia polipeptídica de CTLA-4 "1299" depositada con el n.º de acceso NCIMB 41948 con una o más mutaciones de aminoácidos, por ejemplo, hasta doce, p. ej., hasta diez mutaciones de aminoácidos, p. ej., hasta cinco mutaciones, p. ej., una, dos o tres mutaciones de aminoácidos.

Los polipéptidos de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación pueden comprender o estar constituidos por una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad secuencial con la SEQ ID NO: 68, con cualquiera de las SEQ ID NOS: 36-55, o con la secuencia polipeptídica de CTLA-4 "1299" depositada con el n.º de acceso NCIMB 41948.

La mutación o mutaciones pueden comprender o estar constituidas por sustituciones de aminoácidos y pueden seleccionarse opcionalmente entre las siguientes:

T en el residuo 16; P en el residuo 25; I en el residuo 32; G en el residuo 41; G en el residuo 42; E en el residuo 44; V en el residuo 54; G en el residuo 56; S o P en el residuo 58; A en el residuo 59; P en el residuo 61; G en el residuo 62; V o T en el residuo 65; T, M o H en el residuo 70; V, R, K o L en el residuo 85; S en el residuo 87; T, E o M en el residuo 93; R, Q o E en el residuo 104; V en el residuo 106; D o S en el residuo 108; V o F en el residuo 115; S en el residuo 120; eliminación en el residuo 51.

Preferentemente, un polipéptido comprende N en la posición 25 y/o comprende Q o H en la posición 93. Un polipéptido puede comprender opcionalmente S en la posición 120.

Tal como se ha mencionado anteriormente, un polipéptido comprende preferentemente R, I, S o V en la posición 16; T o A en la posición 24; N en la posición 25; S o G en la posición 27; M o K en la posición 54; N o S en la posición 56; A, L o G en la posición 58; T o S en la posición 59; F o T en la posición 60; L o Q en la posición 61; D o Y en la posición 63; S o P en la posición 64; I, N o D en la posición 65; A o S en la posición 70; Q o R en la posición 80; Q, M o S en la posición 85; Q o H en la posición 93; y/o C o S en la posición 120. Por lo tanto, el polipéptido comprende uno o más, p. ej., al menos cinco o seis de las siguientes sustituciones de aminoácidos, o todas ellas, respecto a la SEQ ID NO: 35 de CTLA-4 de tipo natural: R, S o V en I16; T en A24; N en S25; S en G27; K en M54; S en N56; A o G en L58; S en T59; T en F 60; Q en L61; Y en D63; P en S 64; N o D en I65; A en S70; R en Q80; Q o S en M85; Q o H en K93.

Las mutaciones en las SEQ ID NOS: 36-55 comparadas con el tipo natural se ilustran en la Figura 1A. Un polipéptido de acuerdo con la presente divulgación puede comprender la SEQ ID NO: 35 de CTLA-4 de tipo natural con una o más mutaciones ejemplificadas en estas variantes, por ejemplo, con las combinaciones de las mutaciones presentes en cualquiera de las SEQ ID NOS: 36-55. Un polipéptido puede comprender opcionalmente mutaciones adicionales tal y como se ha discutido anteriormente, p. ej., opcionalmente una o dos mutaciones adicionales.

Por ejemplo, un polipéptido puede comprender una combinación de mutaciones seleccionadas entre:

- las mutaciones de 1315, es decir, S en I16; N en S25; G en L58; A en S70; R en Q80; S en M85; y Q en K93;
- las mutaciones de 1322, es decir, N en S25; S en G27; K en M54; S en N56; S en T59; T en F 60; Q en L61; Y en D63; P en S64; N en I65; y Q en K93;

- las mutaciones de 1321, es decir, S en I16; N en S25; K en M54; G en L58; A en S70; R en Q80; S en M85; y Q en K93;

- las mutaciones de 1115, es decir, V en I16; N en S25; G en L58; A en S70; Q en M85; y Q en K93;

5 - las mutaciones de 1299, es decir, R en I16; T en A24; N en S25; S en G27; A en L58; A en S70; Q en M85; y Q en K93; y

- las mutaciones de 1227, es decir, S en I16; N en S25; S en G27; A en L58; A en S70; Q en M85; y H en K93.

En consecuencia, el polipéptido de CTLA-4 puede ser uno que comprenda la combinación de residuos sustituidos en cualquiera de las DEQ ID NOS: 36-55 respecto al tipo natural, por ejemplo, puede comprender:

10 - S en el residuo 16; N en el residuo 25; G en el residuo 58; A en el residuo 70; R en el residuo 80; S en el residuo 85; y Q en el residuo 93;

- N en el residuo 25; S en el residuo 27; K en el residuo 54; S en el residuo 56; S en el residuo 59; T en el residuo 60; Q en el residuo 61; Y en el residuo 63; P en el residuo 64; N en el residuo 65; y Q en el residuo 93;

- S en el residuo 16; N en el residuo 25; K en el residuo 54; G en el residuo 58; A en el residuo 70; R en el residuo 80; S en el residuo 85; y Q en el residuo 93;

15 - V en el residuo 16; N en el residuo 25; G en el residuo 58; A en el residuo 70; Q en el residuo 85; y Q en el residuo 93;

- R en el residuo 16; T en el residuo 24; N en el residuo 25; S en el residuo 27; A en el residuo 58; A en el residuo 70; Q en el residuo 85; y Q en el residuo 93; o

20 - S en el residuo 16; N en el residuo 25; S en el residuo 27; A en el residuo 58; A en el residuo 70; Q en el residuo 85; y H en el residuo 93.

Preferentemente, una mutación es una sustitución y puede ser una sustitución conservadora. Con la expresión "sustitución conservadora" se quiere dar a entender la sustitución de un primer residuo aminoacídico con un segundo residuo aminoacídico diferente, donde el primer y segundo residuos aminoacídicos tienen cadenas laterales que tienen características biofísicas similares. Las características biofísicas similares incluyen la hidrofobicidad, carga, polaridad o capacidad de proporcionar o aceptar enlaces de hidrógeno. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen el cambio de serina por treonina o triptófano, glutamina por asparagina, lisina por arginina, alanina por valina, aspartato por glutamato, valina por isoleucina, asparagina por serina.

30 Los polipéptidos de acuerdo con la presente divulgación pueden incluir una o más de las mutaciones de secuencias de aminoácidos (sustitución, eliminación y/o inserción de un residuo aminoacídico) y menos de aproximadamente 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2.

Las mutaciones normalmente no provocan una pérdida de función, de modo que un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos alterada de esta manera puede retener la capacidad de unirse al CD86 y/o CD80 humanos. Puede retener la misma función o afinidad de unión que un polipéptido en el cual no se hace ninguna alteración, p. ej., según se mide en un ensayo descrito en la presente.

35 La mutación puede comprender reemplazar uno o más residuos aminoacídicos con un aminoácido que no esté presente de manera natural o no estándar, modificar uno o más residuos aminoacídicos para obtener una forma que no esté presente de manera natural o no estándar, o insertar uno o más aminoácidos que no estén presentes de manera natural o no estándar en la secuencia. En otra parte de la presente se describen ejemplos de números y ubicaciones de alteraciones en secuencias de la presente divulgación. Los aminoácidos que están presentes de manera natural incluyen los 20 L-aminoácidos "estándar" identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E mediante sus códigos estándar de una sola letra. Los aminoácidos no estándar incluyen cualquier otro residuo que pueda incorporarse en un esqueleto polipeptídico o que sea el resultado de la modificación de un residuo aminoacídico existente. Los aminoácidos no estándar pueden estar presentes de manera natural o no estar presentes de manera natural. En la técnica se conocen varios aminoácidos no estándar que están presentes de manera natural, tales como 4-hidroxi prolina, 5-hidroxisilina, 3-metilhistidina, *N*-acetilserina, etc. [Voet y Voet, *Biochemistry*, 2.<sup>a</sup> edición, (Wiley) 1995]. Aquellos residuos aminoacídicos que se derivatizan en su posición *N*-alfa únicamente se ubicarán en el extremo N de una secuencia de aminoácidos. Normalmente en la presente divulgación un aminoácido es un L-aminoácido, pero puede ser un D-aminoácido. La alteración puede comprender, por tanto, modificar un L-aminoácido para obtener un D-aminoácido, o reemplazarlo con este. También se conocen las formas metiladas, acetiladas y/o fosforiladas de los aminoácidos y, en la presente divulgación, los aminoácidos pueden estar sujetos a una modificación de este tipo.

Las secuencias de aminoácidos en los polipéptidos de la presente divulgación pueden comprender los aminoácidos no naturales o no estándar descritos anteriormente. Los aminoácidos no estándar (p. ej., D-aminoácidos) pueden incorporarse en una secuencia de aminoácidos durante la síntesis, o mediante modificación o reemplazo de los aminoácidos estándar "originales" después de la síntesis de la secuencia de aminoácidos.

El uso de aminoácidos no estándar y/o no presentes de manera natural aumenta la diversidad estructural y funcional, y de esta forma puede aumentar el potencial de lograr las propiedades de neutralización y unión deseadas. Adicionalmente, se ha demostrado que los D-aminoácidos y análogos tienen perfiles farmacocinéticos diferentes en comparación con L-aminoácidos estándar, debido a la degradación *in vivo* de polipéptidos que tienen L-aminoácidos después de la administración a un animal, p. ej., un ser humano, lo que significa que los D-aminoácidos suponen una ventaja para algunas aplicaciones *in vivo*.

Las variantes se pueden generar utilizando mutagénesis aleatoria de uno o más genes de VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro de todo el dominio variable. Una técnica de este tipo la describen Gram *et al.* [Gram *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 89:3576-3580], que utilizaron PCR propensa a errores. Otro método que puede utilizarse es dirigir la mutagénesis a regiones o ubicaciones en el polipéptido particulares. Este tipo de técnicas las han publicado Barbas *et al.* [Barbas *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91:3809-3813] y Schier *et al.* [Schier *et al.*, 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551-567].

Todas las técnicas descritas anteriormente se conocen como tales en la técnica y el experto será capaz de utilizar tales técnicas para proporcionar polipéptidos de la presente divulgación utilizando metodología habitual en la técnica.

Se pueden utilizar algoritmos para calcular el % de identidad de dos secuencias de aminoácidos incluidos, p. ej., BLAST [Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 405-410], FASTA [Pearson y Lipman (1988) *PNAS USA* 85: 2444-2448], o el algoritmo de Smith-Waterman [Smith y Waterman (1981) *J. Mol Biol.* 147: 195-197] p. ej., empleando los parámetros por defecto.

De acuerdo con la presente divulgación, se pueden proporcionar composiciones que contienen polipéptidos de CTLA-4 que tienen una actividad biológica mejorada tal como una selectividad potenciada por CD80 respecto a CD86, una mayor afinidad y/o una mayor potencia, y/o pueden presentar una buena reactividad cruzada, una estabilidad mejorada y/o una semivida prolongada en comparación con el CTLA-4 de tipo natural. Tal como se ha discutido detalladamente en la presente, tales propiedades pueden contribuir a una eficacia terapéutica mayor y pueden permitir que se logren beneficios terapéuticos con una dosis menos frecuente o reducida. La estabilidad mejorada puede facilitar la fabricación y formulación en composiciones farmacéuticas.

Un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación se conjuga opcionalmente con una región Fc de IgG, p. ej., como una proteína de fusión. La región Fc se puede modificar para aumentar la semivida *in vivo* de la molécula y para contribuir a la estabilidad global de la composición a la vez que se evitan funciones efectoras de la región Fc no deseadas. La estabilidad mejorada facilita la formulación del producto con concentraciones elevadas, p. ej., para la administración subcutánea.

#### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. (A) Alineación de secuencias variantes de CTLA-4 (SEQ ID NOS: 36-55) con CTLA-4 humano de tipo natural (SEQ ID NO: 35). Las mutaciones respecto al tipo natural se muestran en las celdas sombreadas. La fila superior de la numeración, que comienza en 1, es la numeración a la que se hace referencia en esta memoria descriptiva a menos que se especifique lo contrario. Debajo se muestra la numeración Swiss Prot para comparar. (B) Alineación de las secuencias de la región Fc de IgG1 SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 y SEQ ID NO: 60. La fila superior de la numeración, que comienza en 1, es la numeración a la que se hace referencia en esta memoria descriptiva a menos que se especifique lo contrario. Debajo se muestra la numeración Swiss Prot para comparar.

Figura 2. Secuencia polipeptídica de CTLA-4 SEQ ID NO: 68. Con la numeración secuencial que comienza en Met como la posición 1, la SEQ ID NO: 68 tiene 124 residuos, con variabilidad en los residuos 16, 24, 27, 54, 56, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 65, 70, 80, 85 y 93. Los residuos aminoacídicos en cada una de estas posiciones variables se seleccionan a partir del grupo de residuos indicado en cada ejemplo.

Figura 3. Los perfiles de  $CI_{50}$  de las variantes de CTLA-4 y del CTLA-4 de tipo natural en un formato de fusión con la región Fc en: (A) el ensayo celular dual Raji-Jurkat; (B) el ensayo de linfocitos T CD4+ humanos primarios; (C) en ensayo de reacción mixto de linfocitos de mono cinomolgo.

Figura 4. Especificidad de variantes de CTLA-4 por CD80 y CD86 en comparación con otros ligandos proteicos relacionados. (A) variante 1299. (B) variante 1322.

Figura 5. Demostración de la función efectora nula (ADCC y CDC) para variantes de CTLA-4 con una modificación TM y YTE. (A) ADCC. (B) CDC.

Figura 6. Mejoras en la afinidad monovalente por CD80 y CD86 de las variantes de CTLA-4, en comparación con el CTLA-4 de tipo natural en formato de fusión con la región Fc.

Figura 7. (A) Constructo diseñado para la proteína CTLA-4 tetramérica. (B) Comparación de la potencia en el ensayo Raji Jurkat para el CTLA-4 de tipo natural en el formato de fusión con la región Fc *versus* el CTLA-4 tetramérico.

#### Descripción detallada

La numeración de los residuos de CTLA-4 que se utiliza a lo largo de esta memoria descriptiva es tal y como se muestra en la Figura 1A (fila superior, numeración de la secuencia) y la Figura 2, a menos que se afirme lo contrario. CTLA-4 tiene una secuencia líder que se escinde y se separa y son posibles al menos dos sistemas de numeración diferentes de la proteína madura. La secuencia de CTLA-4 puede comenzar con, entre otros, Ala en la posición 1 (US 5.434.131) o con Met en la posición 1 (Larsen *et al.*, *Am. J. Transplantation* (2005) 5:443-453). A menos que el contexto dicte claramente lo contrario, el sistema de numeración utilizado en la presente es aquel en el que la posición 1 es Met. Esto también corresponde a la numeración que se utiliza generalmente para referirse a los residuos del producto Abatacept.

La numeración de los residuos de la región Fc que se utiliza a lo largo de esta memoria descriptiva es tal y como se muestra en la Figura 1B (fila superior, que comienza en 1), a menos que se afirme lo contrario.

#### 10 *Potencia biológica*

El CTLA-4 soluble compite con el CD28 expresado en la superficie de los linfocitos T, inhibe la unión de los ligandos CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2) al CD28 que de otro modo provocaría la coestimulación y activación del linfocito T. Por lo tanto, el CTLA-4 soluble inhibe la activación de los linfocitos T. La potencia de esta inhibición por parte del CTLA-4 soluble exógeno se puede determinar por ensayos *in vitro*. El CTLA-4 se puede conjugar opcionalmente con otra molécula, p. ej., como una proteína de fusión. Por ejemplo, la región Fc de IgG puede estar presente, tal como se describe en otra parte de la presente. El ensayo se puede utilizar para determinar cualitativamente si un polipéptido de CTLA-4 es más o menos potente que el de tipo natural, utilizando CTLA-4 de tipo natural (opcionalmente conjugado con la región Fc, como puede ser el caso) como un control, y también puede proporcionar información cuantitativa en lo que respecta a la magnitud de la diferencia de potencia. En la técnica hay constancia de métodos para llevar a cabo tales ensayos y para analizar la importancia estadística de los datos para producir de manera fiable información cualitativa o cuantitativa.

La unión de un polipéptido de CTLA-4 se puede medir mediante la producción de IL-2, ya que la unión de CTLA-4 a CD80 y CD86 atenúa la producción de IL-2. Los ensayos adecuados pueden comprender detectar la cantidad de IL-2 producida, por ejemplo, por ELISA.

La reducción en la cantidad de la producción de IL-2 puede ser parcial o total. Un polipéptido de CTLA-4 puede reducir la producción de IL-2 en al menos un 50%, 75% o 80%, más preferentemente al menos un 85%, 90% o 95%, con las concentraciones estudiadas.

Se puede utilizar un ensayo celular dual para identificar los polipéptidos de CTLA-4 con una potencia mayor que la del tipo natural. Los polipéptidos de CTLA-4 se someten a ensayo para medir la inhibición de la señalización. El cultivo conjunto de los linfocitos T que expresan CD28 (p. ej., células Jurkat) y los linfocitos B que expresan CD80 y CD86 (p. ej., células Raji) da como resultado la producción de IL-2, debido a la interacción entre CD28 y los ligandos CD80 y CD86 en presencia de fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés). El IL-2 se detecta posteriormente mediante ELISA. Remítase al Ejemplo 3 para un ejemplo práctico detallado de este ensayo.

Los ensayos de activación de linfocitos T humanos primarios se pueden utilizar para evaluar adicionalmente la potencia de los polipéptidos seleccionados. Los polipéptidos de CTLA-4 se pueden clasificar según su capacidad para inhibir la secreción de IL-2 mediada por CD80/86 de los linfocitos T CD4+ humanos primarios. Los polipéptidos de CTLA-4 también se pueden clasificar según su capacidad para inhibir la proliferación estimulada por anti-CD3 de los linfocitos CD4+ humanos en presencia de células Raji que expresan CD80 y CD86. La proliferación también se puede someter a ensayo utilizando un ensayo luminiscente homogéneo (ATP lite). Una ventaja de este ensayo es que mide la potencia de los polipéptidos de CTLA-4 para bloquear la activación de los linfocitos CD4+ humanos primarios. Remítase al Ejemplo 4 para un ejemplo práctico detallado de este ensayo.

Se ha demostrado que ciertos polipéptidos de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación se unen a CD80 y CD86 con una potencia elevada en un ensayo que mide la activación de linfocitos T. Los polipéptidos de CTLA-4 bloquean los ligandos CD80 y CD86 y de este modo previenen la activación de señales adicional procedente de estas moléculas y conducen a una producción de IL-2 reducida.

La potencia de los polipéptidos de CTLA-4 se puede determinar o medir utilizando uno o más ensayos conocidos por el experto en la técnica y/o según se describe o se hace referencia en la presente. La potencia es una medida de la actividad expresada según la cantidad requerida para producir un efecto. Normalmente, se compara una titulación de un polipéptido en un ensayo celular y se presentan los valores de  $CI_{50}$ . En ensayos funcionales, la  $CI_{50}$  es la concentración de un producto que reduce una respuesta biológica a un 50% de su máximo. La  $CI_{50}$  puede calcularse trazando el gráfico del % de la respuesta biológica máxima en función del log de la concentración del producto, y utilizando un programa de software, tal como Prism (GraphPad) para ajustar una función sigmoidea a los datos para generar los valores de  $CI_{50}$ . Cuanto más bajo sea el valor de  $CI_{50}$ , más potente será el producto.

Los polipéptidos de CTLA-4 se pueden describir como polipéptidos que tienen una mayor potencia ya que se necesita menos cantidad en comparación con un polipéptido de CTLA-4 de referencia (p. ej., tipo natural), para producir la inhibición de la producción de IL-2. Esto también se refleja en los valores de  $CI_{50}$  presentados. Los polipéptidos de CTLA-4 preferidos tienen una potencia mayor en comparación con el CTLA-4 de tipo natural humano (SEQ ID NO: 35).



Un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación puede tener una mayor potencia que el CTLA-4 de tipo natural que comprende la SEQ ID NO: 35, donde la potencia es una reducción en la  $CI_{50}$  en un ensayo de la producción de IL-2 utilizando linfocitos T activados por linfocitos B. La potencia puede ser al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces o al menos 50 veces superior a la del tipo natural. Tal como se describe en los Ejemplos en la presente, se mostró que un polipéptido de SEQ ID NO: 36 (variante 1315) tenía una potencia aproximadamente 120 veces superior a la del CTLA-4 de tipo natural. La potencia puede ser, por ejemplo, de hasta 150 veces, de hasta 130 veces, de hasta 120 veces, de hasta 100 veces, de hasta 80 veces, de hasta 70 veces o de hasta 60 veces superior a la del tipo natural. La mejora de la potencia puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 10 veces a 100 veces superior a la del tipo natural.

La potencia de un polipéptido de CTLA-4 se puede determinar haciendo referencia a las secuencias polipeptídicas de CTLA-4 ejemplificadas en la presente, en vez de (o así como) haciendo referencia al tipo natural, p. ej., la potencia se puede comparar con cualquiera de las siguientes: SEQ ID NO: 37 (variante 1322), SEQ ID NO: 38 (variante 1321), SEQ ID NO: 43 (variante 1299), SEQ ID NO: 36 (variante 1315), SEQ ID NO: 42 (variante 1115), SEQ ID NO: 47 (variante 1227) o la variante 1299 según la codifica el ácido nucleico depositado con el n.º de acceso NCIMB 41948. Por lo tanto, una de estas variantes de CTLA-4 se puede utilizar como un control en el ensayo. Un polipéptido de CTLA-4 puede ser al menos tan potente como una o más de estas variantes, p. ej., al menos tan potente como la SEQ ID NO: 43 (variante 1299) o la SEQ ID NO: 47 (variante 1227). Un polipéptido de CTLA-4 puede tener una potencia que es aproximadamente igual o inferior a la potencia de la SEQ ID NO: 36 (variante 1315).

#### *Afinidad*

La afinidad de un polipéptido de CTLA-4 para unirse a CD80 o CD86 se puede determinar como afinidad monovalente, utilizando la resonancia de plasmones superficiales para determinar la Kd. Remítase al Ejemplo 8 para un ejemplo práctico de la utilización de la resonancia de plasmones superficiales para medir la afinidad de unión y para determinar la Kd. La Kd resultante se puede comparar con la SEQ ID NO: 35 del CTLA-4 de tipo natural o comparar con la de una de las siguientes secuencias de los polipéptidos de CTLA-4: SEQ ID NO: 37 (variante 1322), SEQ ID NO: 38 (variante 1321), SEQ ID NO: 43 (variante 1299), SEQ ID NO: 36 (variante 1315), SEQ ID NO: 42 (variante 1115), SEQ ID NO: 47 (variante 1227) o la variante 1299 según la codifica el ácido nucleico depositado con el n.º de acceso NCIMB 41948 para determinar la afinidad relativa. Un polipéptido de CTLA-4 puede tener una afinidad superior para unirse al CD86 humano y/o al CD80 humano, en comparación con la afinidad del CTLA-4 de tipo natural.

Un polipéptido de CTLA-4 puede tener una afinidad para unirse al CD80 humano que es superior a la del CTLA-4 de tipo natural, p. ej., al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces o al menos 140 veces superior a la del tipo natural. El polipéptido de CTLA-4 puede tener al menos la afinidad para unirse al CD80 humano de una o más de las siguientes secuencias: la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 42 y la SEQ ID NO: 47 o al menos la afinidad de la variante de CTLA-4 1299 tal como la codifica el ácido nucleico depositado con el n.º de acceso NCIMB 41948. Un polipéptido de CTLA-4 puede tener una afinidad para unirse al CD80 humano que es aproximadamente igual o inferior a la afinidad de la SEQ ID NO: 37. La Kd para unirse al CD80 humano puede ser 50 nM o inferior, p. ej., 25 nM o inferior, 20 nM o inferior o 10 nM o inferior. Por ejemplo, la Kd puede estar comprendida en el intervalo entre 5 y 50 nM.

Un polipéptido de CTLA-4 puede tener una afinidad para unirse al CD86 humano que es superior a la del CTLA-4 de tipo natural, p. ej., al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces o al menos 10 veces superior a la del tipo natural. El polipéptido de CTLA-4 puede tener al menos la afinidad para unirse al CD86 humano de una o más de las siguientes secuencias: la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 42 y la SEQ ID NO: 47 o al menos la afinidad de la variante de CTLA-4 1299 tal como la codifica el ácido nucleico depositado con el n.º de acceso NCIMB 41948. Un polipéptido de CTLA-4 puede tener una afinidad para unirse al CD86 humano que es aproximadamente igual o inferior a la afinidad de la SEQ ID NO: 37. La Kd para unirse al CD86 humano puede ser 2  $\mu$ M o inferior, p. ej., 1.5  $\mu$ M o inferior o 1  $\mu$ M o inferior. Por ejemplo, la Kd puede estar comprendida en el intervalo entre 0.5 y 2  $\mu$ M.

#### *Selectividad por CD80 respecto a CD86*

Los polipéptidos de CTLA-4 descritos en la presente se pueden unir tanto a CD80 como a CD86, pero se pueden unir selectivamente a CD80, con preferencia respecto a CD86. Hay constancia de que el CTLA-4 de tipo natural tiene una afinidad superior para unirse a CD80 en comparación con CD86, y un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación también puede tener una afinidad superior para unirse a CD80 que para unirse a CD86. Sin embargo, un polipéptido de CTLA-4 puede tener una selectividad superior para unirse a CD80 con preferencia respecto a CD86, en comparación con el CTLA-4 de tipo natural. Por ejemplo, en los ensayos de resonancia de plasmones superficiales, tal como se describe en la presente, el CTLA-4 de tipo natural exhibió una afinidad aproximadamente 4 veces superior para unirse a CD80 que para unirse a CD86. Por el contrario, los polipéptidos de CTLA-4 pueden exhibir una afinidad más de 10 veces, más de 20 veces, más de 30 veces, más de 40 veces o más de 50 veces superior para unirse a CD80 que para unirse a CD86. Por ejemplo, un polipéptido de CTLA-4 puede exhibir una afinidad hasta 120 veces o 130 veces superior para unirse a CD80 que para unirse a CD86. Por lo tanto, cuando se compara con la afinidad del CTLA-4 de tipo natural, un polipéptido de CTLA-4 puede exhibir un aumento superior en la afinidad de unión a CD80 que a CD86. La preferencia selectiva por CD80 respecto a CD86 se puede observar con el CD80 humano y el CD86 humano.

Además, la misma preferencia selectiva se puede retener con CD80 y CD86 procedentes de mono cinomolgo. La diferencia en número de veces de la afinidad para unirse a CD80 respecto a CD86 puede ser aproximadamente igual para CD80 y CD86 humano y cinomolgo.

5 Las mejoras en la afinidad para unirse a CD80 deberían conferir un perfil biológico mejor para un uso médico. Uniéndose a CD80, que ha experimentado un aumento regulado en las células presentadoras de antígeno en el contexto de una respuesta inmunitaria activa, CTLA-4 inhibe la unión de CD80 al CD28 de los linfocitos T, y bloquea de esta manera la señal de activación al linfocito T. Por lo tanto, el polipéptido de CTLA-4 se puede utilizar para atenuar la respuesta de linfocitos T *in vivo* y para tratar afecciones en las que esto es beneficioso, tal como se describe en otra parte de la presente.

10 Modificando un polipéptido de CTLA-4 que se dirige a CD80 selectivamente respecto a CD86, se pueden obtener ganancias en la afinidad muy grandes para la unión a CD80. Aunque la bibliografía no resulta concluyente respecto a las funciones relativas de CD80 y CD86, los polipéptidos de la presente divulgación se unen selectivamente a CD80 respecto a CD86 y exhiben excelentes perfiles biológicos adecuados para su uso terapéutico, tal como se muestra en los diversos ensayos. Sin ceñirse a ninguna teoría, los atributos de los polipéptidos de CTLA-4 de la presente pueden ser atribuibles al menos en parte a la afinidad elevada para unirse a CD80 y/o a la unión preferencial de CD80 respecto a CD86.

15 Diversos datos señalan hacia una función de CD80 en el suministro de una señal de activación mayor a los linfocitos T. Por ejemplo:

las células CHO transducidas con CD80 inducen un incremento en la producción de IL-2 de linfocitos T humanos primarios en comparación con las células CHO transducidas con CD86 (Slavik *et al. JBC* 274(5):3116-3124 1999);

20 CD80 induce un incremento en la actividad del factor de transcripción AP-1 y NFκB en comparación con CD86 en los linfocitos T Jurkat (factores importantes para la producción de citocinas tales como IL-2) (Olsson *et al. Int. Immunol.* 10(4):499-506 1998);

CD80 induce un incremento en la expresión de CD25 en los linfocitos T CD8+ que interactúan con las células dendríticas infectadas por virus en comparación con CD86 (importante para la supervivencia y proliferación de los linfocitos T) (Pejawaar-Gaddy y Alexander-Miller *J. Immunol.* 177:4495-4502 2006); y

25 en un modelo murino de asma alérgica, que utiliza una molécula de CTLA-4 Ig mutada, se observó que CD80, pero no CD86, era un controlador principal de la eosinofilia pulmonar (Harris *et al. J. Exp. Med.* 185(1) 1997).

Incrementando preferentemente la afinidad de CTLA-4 por CD80 se puede conseguir de este modo una mejor inhibición de la activación de los linfocitos T actuando sobre la ruta más eficiente de activación de los linfocitos T por CD80.

30 Además, existe cierta evidencia de que la señalización de CD86 puede tener un efecto antiinflamatorio beneficioso en algunos modelos de enfermedades. Por ejemplo, en un modelo de septicemia en ratones, se observó que la gravedad y mortalidad estaban asociadas con el aumento regulado de CD80 y el descenso regulado concomitante de CD86 (Nolan *et al. PLoS ONE* 4(8):6600 2009). Por lo tanto, una unión selectiva de CD80 respecto a CD86 puede proporcionar una ventaja debido a que puede inhibir la unión de CD80 a CD28, a la vez que reduce la interacción de CD28 en menor grado.

35 En las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide se pueden encontrar tanto células con CD80 como células con CD86, y la unión de estas dos moléculas B7 puede contribuir a la eficacia terapéutica, a la vez que la selectividad por CD80 respecto a CD86 puede contribuir adicionalmente a efectos cuantitativos y cualitativos deseables en la inhibición de la activación de linfocitos T. En consecuencia, los polipéptidos de CTLA-4 de la presente divulgación se pueden unir tanto a CD80 como a CD86, y pueden tener una afinidad superior por CD80 que la del CTLA-4 de tipo natural, y también pueden tener una afinidad superior por CD86 que la del CTLA-4 de tipo natural.

#### 40 *Reactividad cruzada*

Preferentemente, los polipéptidos de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación retienen el perfil de reactividad cruzada del CTLA-4 de tipo natural.

45 Un polipéptido de CTLA-4 puede mostrar una reactividad cruzada para unirse a CD80 y CD86 murinos y/o cinomolgos, así como a CD80 y CD86 de humanos. La diferencia en la afinidad por CD80 cinomolgo en comparación con CD80 humano puede estar comprendida en 10 veces, comprendida en 5 veces, comprendida en 2 veces, comprendida en 1.5 veces o comprendida en 1.2 veces. La diferencia en la afinidad por CD86 cinomolgo en comparación con CD86 humano puede estar comprendida en 10 veces, comprendida en 5 veces, comprendida en 2 veces, comprendida en 1.5 veces o comprendida en 1.2 veces. La diferencia en la afinidad por CD80 murino en comparación con CD80 humano puede estar comprendida en 10 veces, comprendida en 5 veces, comprendida en 2 veces, comprendida en 1.5 veces o comprendida en 1.2 veces. La diferencia en la afinidad por CD86 murino en comparación con CD86 humano puede estar comprendida en 10 veces, comprendida en 5 veces, comprendida en 2 veces, comprendida en 1.5 veces o comprendida en 1.2 veces.

50 Un polipéptido de CTLA-4 puede inhibir la activación de linfocitos T cinomolgos, p. ej., medida como inhibición de la producción de IL-2 en una reacción mixta de linfocitos utilizando células mononucleares sanguíneas periféricas

procedentes de monos cinomolgos. El polipéptido puede mostrar una potencia mayor que la del CTLA-4 de tipo natural en un ensayo para inhibir la activación de linfocitos T cinomolgos.

En el Ejemplo 8 se muestran datos sobre la reactividad cruzada entre especies, por ejemplo, para los polipéptidos de CTLA-4 de la presente divulgación.

- 5 Un polipéptido de CTLA-4 puede mostrar una unión específica a CD80 y CD86 con preferencia respecto a otras proteínas relacionadas de la familia B7. Por lo tanto, puede haber una ausencia de reactividad cruzada con PD-L2, B7-H1, B7-H2, B7-H3 y B7-H3B.

En la técnica hay constancia de ensayos para determinar la especificidad. Por ejemplo, se puede utilizar un enzimoimmunoensayo. Remítase al Ejemplo 6 para un ejemplo práctico de un ensayo adecuado.

10 *Estabilidad*

Un polipéptido de CTLA-4 retiene preferentemente al menos la estabilidad del CTLA-4 de tipo natural y es preferentemente más estable que el tipo natural, p. ej., según se mide para el CTLA-4 solo o CTLA-4 conjugado (p. ej., fusionado) con una región Fc tal como se describe posteriormente.

- 15 Se cree que los conjugados CTLA-4 Fc más estables ("CTLA-4 Ig") serán más capaces de tolerar la formulación con las concentraciones elevadas (p. ej.,  $\geq 100$  mg/mL) requeridas para el suministro subcutáneo.

20 La estabilidad se puede estudiar en un ensayo de degradación. Normalmente, esto comprende incubar el producto a una temperatura fijada (p. ej., 5 °C o 25 °C) durante un periodo de tiempo, p. ej., durante un mes, y determinar el grado de pérdida de pureza (grado de degradación) a lo largo de ese mes. La agregación y/o fragmentación puede contribuir a la pérdida de pureza, y cada una se puede medir por separado para determinar un porcentaje, de dos valores que contribuyen al % de la pérdida de pureza. En el Ejemplo 9 y el Ejemplo 10 se exponen ejemplos prácticos de ensayos de degradación.

Un polipéptido de CTLA-4 con una estabilidad mejorada puede ser más manejable para las vías de administración tales como la administración subcutánea debido a la agregación reducida, que no solo aumenta la eficacia sino que también reduce el riesgo de inducir anticuerpos de unión o neutralización.

25 *Conjugación con Fc*

En un aspecto, la presente divulgación proporciona una molécula de CTLA-4 Ig con una afinidad optimizada, opcionalmente con una semivida prolongada (p. ej., que incluye una mutación YTE, descrita adicionalmente en la presente), para la formulación subcutánea o intravenosa, y para una dosificación mensual, con un intervalo de 28 días o menos frecuente para el tratamiento de RA de moderada a grave u otras afecciones según se describen.

- 30 La presente divulgación proporciona un polipéptido que consiste en una secuencia polipeptídica de CTLA-4 o que comprende una secuencia peptídica o polipeptídica o que está conjugado con ella, p. ej., a una molécula que es un anticuerpo o una parte de una molécula que es un anticuerpo. Por ejemplo, un polipéptido de CTLA-4 puede conjugarse con una secuencia de aminoácidos de la región Fc de un anticuerpo, p. ej., la región Fc de IgG. Una región Fc comprende una bisagra y una región CH2 y CH3. Preferentemente, la IgG es IgG humana, p. ej., IgG1, IgG2 o IgG4.

- 35 Hay constancia de variantes alotípicas de IgG1. Preferentemente, una región Fc de IgG1 comprende E en el residuo 142 y M en el residuo 144 (numeración correspondiente a la SEQ ID NO: 56, que comienza en 1 tal y como se muestra en la Figura 1). Este alotipo está bien representado en la población general. Una región Fc de IgG1 alternativa, que representa un alotipo diferente, comprende D en el residuo 142 y L en el residuo 144. Este alotipo se emplea en Abatacept.

40 La secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG puede comprender la secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG humana (p. ej., IgG1 o IgG4) con ciertas mutaciones. Por ejemplo, cuando la IgG humana es IgG1, la secuencia de aminoácidos puede estar mutada para reducir o anular las funciones efectoras de la región Fc, p. ej., la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés). La eliminación de las funciones efectoras de la región Fc se puede confirmar en ensayos habituales conocidos. Remítase al Ejemplo 7 para ensayos ilustrativos para determinar ADCC y CDC.

- 45 Hay constancia de que la función efectora de la IgG1 se puede reducir por la mutación de la región bisagra de Fc de IgG1. Un ejemplo de esto se encuentra en el constructo CTLA-4 - región Fc de IgG1 de Abatacept, que incorpora una secuencia bisagra mutada en la región Fc de IgG1, en la cual el C de tipo natural está mutado en S. La región de IgG1 de Abatacept incluye una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 71, que corresponde a una secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG1 humana de tipo natural SEQ ID NO: 70 con el C de tipo natural que está sustituido por S. Las sustituciones están en los residuos 6, 12 y 15 de la región Fc.

SEQ ID NO: 70 VEPKSCDKTHTCPPCPAPE

SEQ ID NO: 71 QEPKSSDKTHTSPSPAPE

- En el contexto de la presente divulgación se ha descubierto sorprendentemente que esta mutación reduce la estabilidad del dominio Fc, de modo que la molécula de fusión CTLA4 - región Fc de IgG1 de Abatacept tiene una estabilidad global menor que una molécula de fusión CTLA-4 - región Fc de IgG1 en la cual se utiliza la secuencia de la región Fc de IgG1 de tipo natural. Esta pérdida de estabilidad es indeseable, pero sin embargo es importante para reducir o evitar la función efectora de la región Fc de IgG1.
- Una región Fc conjugada con un polipéptido de CTLA-4 de la presente divulgación preferentemente no comprende la SEQ ID NO: 71. Preferentemente, se retienen las cisteínas en los residuos 6, 12 y/o 15 de la región Fc. Preferentemente, un conjugado CTLA-4 - Fc de acuerdo con la presente divulgación comprende una región bisagra de Fc de IgG1 humana de tipo natural. Preferentemente, la región Fc comprende la SEQ ID NO: 70. La región Fc puede ser la región Fc del polipéptido de CTLA4-Ig 1299 según lo codifica el ácido nucleico depositado con el n.º de acceso NCIMB 41948.
- Aunque la vuelta de la región Fc de Abatacept al tipo natural elimina la inestabilidad provocada por la mutación Fc, esta también restaura las funciones efectoras de la región Fc de IgG1, que son indeseables en muchas aplicaciones terapéuticas. En consecuencia, esta mutación mejora la estabilidad del dominio Fc de Abatacept pero únicamente a expensas de reintroducir la indeseable función efectora.
- Se pueden utilizar otras regiones Fc de IgG con una función efectora menor o nula, p. ej., de IgG2.
- La presente divulgación proporciona una manera de utilizar la región Fc de IgG1 que carece de funciones efectoras, a la vez que supera el problema de la estabilidad reducida inherente a la mutación de Abatacept. Una región Fc de acuerdo con la presente divulgación puede ser una región Fc de IgG1 que comprende una mutación triple (TM, por sus siglas en inglés) L20F, L21E, P117S (Oganesyan *et al.* 2008 *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 64:700-4). Esta mutación reduce la función efectora de la región Fc sin reducir la estabilidad. En consecuencia, un dominio Fc de este tipo facilita la formulación de los constructos de CTLA-4 - Fc con concentraciones elevadas, que son adecuadas para la producción de composiciones para la administración subcutánea.
- Todavía se pueden conseguir más beneficios mediante la incorporación de una mutación "YTE" en la región Fc (Dall'Acqua *et al.*, 2006 *J Biol Chem.* 281:23514-24). La mutación YTE proporciona una semivida *in vivo* prolongada, que puede mejorar la eficacia terapéutica y/o puede permitir que se consigan beneficios terapéuticos con una dosificación reducida o menos frecuente, tal como una dosificación mensual. Un dominio Fc utilizado en los productos de la presente divulgación puede comprender Y en el residuo 38, T en el residuo 40 y E en el residuo 42. Esto representa una mutación M38Y, S40T, T42E de la región Fc de IgG1 humana.
- Aparte de la mutación triple y/o YTE mencionadas anteriormente, se prefiere que los otros residuos del dominio Fc sean residuos de IgG humana de tipo natural. Hay constancia de algunas variaciones en la región Fc de IgG1 humana, y la región Fc puede comprender cualquier IgG1 humana con la mutación triple y/o YTE.
- Preferentemente, un polipéptido de CTLA-4 se conjuga con una secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG1 SEQ ID NO: 59. Esta incluye una región bisagra de Fc de IgG1 humana, carece de la mutación de Abatacept de C en S, incorpora la mutación triple para reducir la función efectora e incluye la prolongación de la semivida de YTE.
- Las regiones Fc mejoradas descritas en la presente se pueden utilizar junto con el CTLA-4 de tipo natural, pero proporcionan aún más beneficios cuando se conjugan con un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación. Un polipéptido de CTLA-4 se puede conjugar en su extremo C con el extremo N de una región Fc, opcionalmente mediante uno o más aminoácidos de conexión o mediante un péptido conector. Preferentemente, el conjugado es una proteína de fusión CTLA-4 - Fc.
- Por ejemplo, un polipéptido de CTLA-4 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 42 o la SEQ ID NO: 47 se puede conjugar con una secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG SEQ ID NO: 59 o con la secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG SEQ ID NO: 60.
- Una proteína de fusión CTLA-4 - región Fc de IgG de acuerdo con la presente divulgación puede comprender la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 16.
- El polipéptido 1299 de CTLA-4 - región Fc de IgG codificado por el ácido nucleico depositado con el n.º de acceso NCIMB 41948 es un aspecto de la presente divulgación. El polipéptido 1299 de CTLA-4 codificado por el ácido nucleico depositado con el n.º de acceso NCIMB 41948 puede conjugarse de manera alternativa con una región Fc diferente si se desea.
- Productos del polipéptido de CTLA-4*
- Los polipéptidos de CTLA-4, incluido el CTLA-4 - Fc, pueden ser monoméricos o multiméricos, p. ej., dimericos, triméricos, tetraméricos o pentaméricos. Tal como se ha discutido en otra parte en la presente, CTLA-4 puede formar dímeros. Esta dimerización natural puede promoverse conjugando el CTLA-4 a un dominio Fc o a otro dominio dimerizante.
- Los multímeros polipeptídicos que comprenden una pluralidad de polipéptidos de CTLA-4 son un aspecto de la presente divulgación. La pluralidad de polipéptidos de CTLA-4 en el multímero pueden ser idénticos o diferentes entre sí. Un

multímero puede comprender algunos polipéptidos idénticos y/o algunos polipéptidos diferentes. Un multímero puede comprender uno o más polipéptidos de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación, y uno o más polipéptidos diferentes. El polipéptido o los polipéptidos diferentes pueden incluir, por ejemplo, un CTLA-4 de tipo natural y/o un polipéptido que no es un polipéptido de CTLA-4.

- 5 El multímero puede ser un dímero que comprende dos polipéptidos de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación, que pueden ser idénticos (un homodímero) o diferentes (un heterodímero).

El multímero puede ser un tetrámero que comprende cuatro polipéptidos de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación, que pueden ser todos ellos idénticos (un homotetrámero) o pueden incluir uno o más polipéptidos de CTLA-4 diferentes de acuerdo con la presente divulgación (un heterotetrámero). El multímero puede ser un tetrámero que comprende dos polipéptidos de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación (idénticos o diferentes entre sí) y otros dos polipéptidos de CTLA-4, tales como el CTLA-4 de tipo natural.

10 Cuando el CTLA-4 está en forma multimérica, el polipéptido de CTLA-4 está conjugado opcionalmente con una región Fc de inmunoglobulina y/o una molécula que es un anticuerpo. El conjugado puede o no incluir un sitio de unión antígeno anticuerpo, un dominio VH o un dominio VL.

15 Un aspecto de la presente divulgación es un conjugado que comprende uno o más, p. ej., dos, tres, cuatro o cinco polipéptidos de CTLA-4 y una molécula que es un anticuerpo o un dominio de anticuerpo, preferentemente humanos. Los dominios de CTLA-4 dimerizados se pueden conjugar con pares de cadenas pesada-ligera de un anticuerpo. Una molécula que es un anticuerpo puede comprender dos pares de cadenas pesada-ligera, comprendiendo cada cadena pesada un dominio VH y uno o más dominios de cadena pesada constantes (p. ej., CH1, CH2 y CH3), y comprendiendo cada cadena ligera un dominio VL y una región constante de la cadena ligera, donde los dos pares de cadenas pesada-ligera están unidos mediante dimerización de los dominios constantes de cadena pesada y donde los cuatro polipéptidos de CTLA-4 están conjugados con la molécula que es un anticuerpo, estando un CTLA-4 unido a cada uno de los cuatro dominios variables. Una región constante de la cadena ligera puede ser una cadena ligera lambda o kappa. Se pueden unir un par de moléculas CTLA-4 a cada par de dominios VH-VL, donde el polipéptido de CTLA-4 unido al dominio VH forma un dímero con el polipéptido de CTLA-4 unido al dominio VL. Preferentemente, se fusiona el extremo C de CTLA-4 con el extremo N del dominio VH o VL. Preferentemente, el apareamiento de VH y VL no conferiría ninguna unión a antígenos humanos conocidos.

Opcionalmente, parte o todo el dominio VH y/o VL del anticuerpo se elimina, de modo que un polipéptido de CTLA-4 se incluye en lugar del dominio VH y/o VL, o en lugar de una parte de estos. En consecuencia un dímero puede comprender un par de polipéptidos de CTLA-4, uno fusionado con una región constante de la cadena ligera de un anticuerpo y uno fusionado a una región constante de la cadena pesada de un anticuerpo. Un tetrámero puede comprender, en consecuencia, dos pares de polipéptidos de CTLA-4, donde cada par comprende un polipéptido de CTLA-4 fusionado con una región constante de la cadena ligera de un anticuerpo y un polipéptido de CTLA-4 fusionado con una región constante de la cadena pesada de un anticuerpo. Tal como se ha mencionado anteriormente, una región constante de la cadena pesada comprende uno o más dominios constantes de la cadena pesada, p. ej., CH1, CH2 y CH3, y una región constante de la cadena ligera puede ser lambda o kappa.

La presente divulgación también incluye pentámeros de CTLA4. Se pueden ensamblar cinco polipéptidos de CTLA4 para formar un pentámero, opcionalmente mediante pentamerización de las regiones Fc de un anticuerpo unidas. La formación del pentámero se facilita utilizando la región Fc de IgM, que es pentamérica de manera natural. Por lo tanto, los cinco polipéptidos de CTLA4-Fc que incluyen la región Fc de IgM, preferentemente IgM humana, se pueden disponer como un pentámero. Se ha descrito el CTLA4 pentamérico (Yamada *et al. Microbiol. Immunol.* 40(7):513-518 1996).

Los polipéptidos comprendidos en un multímero se pueden unir covalentemente, p. ej., mediante enlaces disulfuro. Los enlaces covalentes pueden estar presentes entre el polipéptido de CTLA4 y/o entre la región Fc unida al polipéptido de CTLA-4. Cuando se emplean regiones Fc y/u otros dominios de anticuerpos, se pueden unir los polipéptidos del mismo modo que ocurre de manera natural para tales dominios Fc y/u otros dominios de anticuerpos. La formación de enlaces disulfuro entre residuos de cisteína de polipéptidos de CTLA-4 se describe en otra parte en la presente.

Tales multímeros y conjugados se pueden utilizar en cualquier método o para cualquier uso tal como se describe en la presente para polipéptidos de CTLA-4. La estructura multimérica puede promover la actividad biológica de CTLA-4, p. ej., inhibiendo la activación de linfocitos T. Se muestra que la inhibición de CTLA-4 de tipo natural está potenciada en la forma tetramérica (Ejemplo 11, Figura 7).

Un polipéptido de CTLA-4 puede estar marcado o sin marcar. Se puede añadir una marca a la secuencia de CTLA-4 o a una región Fc conjugada con esta.

El CTLA-4 y/o la región Fc pueden estar glucosilados o no glucosilados. Preferentemente, el CTLA-4 y/o la región Fc portan su glucosilación humana normal.

55 Los polipéptidos de CTLA-4 tal como se describen en la presente pueden estar modificados y desarrollados adicionalmente para proporcionar variantes adicionales mejoradas o alteradas. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación descrita en la presente se puede modificar

introduciendo una o más mutaciones, p. ej., sustituciones, para proporcionar un polipéptido de CTLA-4 adicional, que se puede entonces estudiar para determinar su potencia, afinidad (por CD80 y/o CD86) y/o estabilidad, p. ej., tal como se describe en otra parte en la presente.

5 Los polipéptidos de CTLA-4 retienen preferentemente una o más propiedades funcionales deseadas tal como se describe en la presente. Tales propiedades incluyen la capacidad de unirse a CD80 y/o CD86, la capacidad de unirse a CD80 y/o CD86 con una afinidad superior a la del CTLA-4 de tipo natural, y/o una potencia, afinidad y/o estabilidad tal como se describe en la presente para los polipéptidos de CTLA-4 de la presente divulgación, p. ej., una KD para unirse al CD80 humano de 50 nM o inferior según se determina por resonancia de plasmones superficiales. Tal como se describe en la presente, un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación tiene normalmente una mayor afinidad para unirse al CD80 humano, mayor potencia y/o mayor estabilidad en comparación con la SEQ ID NO: 35 de CTLA-4 de tipo natural.

15 Un polipéptido de CTLA-4 puede comprender o estar constituido por una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% con cualquiera de las SEQ ID NOS: 36-55, por ejemplo, con la SEQ ID NO: 43, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 42 o la SEQ ID NO: 47. Un polipéptido de CTLA-4 puede comprender o estar constituido por una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% con la SEQ ID NO: 68. Un polipéptido de CTLA-4 puede comprender o estar constituido por una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98% o al menos un 99% con la secuencia de aminoácidos de CTLA-4 codificada por el ácido nucleico depositado con el n.º de acceso NCIMB 41948.

25 Un polipéptido de CTLA-4 puede comprender o estar constituido por cualquiera de las SEQ ID NOS: 36-55, la SEQ ID NO: 68 o la secuencia de aminoácidos de CTLA-4 codificada por el ácido nucleico depositado con el n.º de acceso NCIMB 41948, con una o más mutaciones de aminoácidos. Por ejemplo, puede comprender hasta doce, p. ej., hasta diez mutaciones de aminoácidos, p. ej., hasta cinco mutaciones, p. ej., una, dos o tres mutaciones de aminoácidos. En otra parte en la presente se describen ejemplos de mutaciones.

30 Tras la introducción de una o más mutaciones, se puede estudiar un polipéptido de CTLA-4 para determinar las propiedades funcionales deseadas tales como la capacidad de unirse a CD80 y/o CD86, la capacidad de unirse a CD80 y/o CD86 con una afinidad superior a la del CTLA-4 de tipo natural, y/o una potencia, afinidad y/o estabilidad tal como se describe en la presente para los polipéptidos de CTLA-4 de la presente divulgación, p. ej., una KD para unirse al CD80 humano de 50 nM o inferior según se determina por resonancia de plasmones superficiales.

Un aspecto de la presente divulgación es un método que comprende proporcionar un polipéptido de CTLA-4 que comprende o está constituido por una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de CTLA-4 según se describe en la presente; introducir una o más mutaciones en la secuencia de aminoácidos para proporcionar un polipéptido de CTLA-4 adicional; y estudiar la estabilidad, afinidad y/o potencia del polipéptido de CTLA-4 adicional.

40 La secuencia de aminoácidos de un polipéptido de CTLA-4 puede comprender o estar constituida, por ejemplo, por cualquiera de las SEQ ID NOS 36-55 o la SEQ ID NO: 68 o la secuencia de aminoácidos de CTLA-4 codificada por el ácido nucleico depositado con el n.º de acceso NCIMB 41948. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede ser la SEQ ID NO: 43, 37, 36, 38, 42 o 47.

Se pueden introducir opcionalmente entre una y veinte mutaciones inclusive, y pueden comprender sustituciones, eliminaciones, inserciones o una mezcla de cualquiera de estas. Por ejemplo, se pueden introducir una o más sustituciones, p. ej., entre una y veinte sustituciones inclusive.

45 En la presente se describen ejemplos de ensayos para estudiar la estabilidad, afinidad y/o potencia del polipéptido de CTLA-4 adicional. El polipéptido adicional puede tener una estabilidad, afinidad y/o potencia que no es significativamente inferior, o que es superior, a la del polipéptido de CTLA-4 del cual se deriva.

El método puede comprender determinar que el polipéptido de CTLA-4 adicional tiene una potencia, afinidad y/o estabilidad como se describe en la presente para los polipéptidos de CTLA-4 de la presente divulgación, p. ej., que tiene una KD para unirse al CD80 humano de 50 nM o menos según se determina por resonancia de plasmones superficiales.

50 Un polipéptido de CTLA-4 adicional identificado como que tiene una potencia, afinidad y/o estabilidad como se describe en la presente para los polipéptidos de CTLA-4 de la presente divulgación se puede formular entonces en una composición farmacéutica o utilizarse en métodos que incluyen métodos terapéuticos como se describen en la presente.

El método puede comprender formular el polipéptido de CTLA-4 adicional en una composición que comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Este tipo de composiciones, su uso y formulación se describen más

detalladamente en otra parte de la presente. El polipéptido de CTLA-4 se puede proporcionar en cualquier formato descrito en la presente, p. ej., se puede conjugar con una región Fc según se describe.

Se puede producir una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de CTLA-4, p. ej., un constructo CTLA-4 - Fc. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede codificar cualquier secuencia de aminoácidos del polipéptido de CTLA-4 o la secuencia de aminoácidos de CTLA-4 - Fc de acuerdo con la presente divulgación. El ácido nucleico puede comprender la secuencia de ácido nucleico depositada con el n.º de acceso NCIMB 41948 que codifica el polipéptido 1299 de CTLA-4-Ig o que codifica al menos la región del polipéptido de CTLA-4 de este. La molécula de ácido nucleico se puede aislar y puede estar comprendida en un vector, p. ej., un vector recombinante para la expresión del ácido nucleico en una célula. Una célula *in vitro* puede comprender el vector, y se puede utilizar para la expresión del polipéptido de CTLA-4 o el producto CTLA-4 de la región Fc. El polipéptido se puede expresar por parte de la línea celular de *E. coli* con el número de acceso al depósito NCIMB 41948.

Un polipéptido de CTLA-4 como se describe en la presente se puede producir mediante un método que incluye expresar el polipéptido a partir del ácido nucleico codificante. Esto se puede lograr convenientemente cultivando una célula hospedadora en un cultivo, que contiene un vector de este tipo, en condiciones apropiadas que provocan o permiten la expresión del polipéptido de CTLA-4. Los polipéptidos de CTLA-4 también se pueden expresar en sistemas *in vitro*, tales como el lisado de reticulocitos. Tras la producción de un polipéptido de CTLA-4 por expresión, se puede estudiar de manera rutinaria su actividad, por ejemplo, su capacidad para unirse a CD86 o CD80.

Son muy conocidos los sistemas para clonar y expresar un polipéptido en una variedad de diferentes células hospedadoras y se pueden emplear para la expresión de los polipéptidos de CTLA-4 descritos en la presente, incluidos los polipéptidos de CTLA-4 - Fc. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células eucariotas tales como de mamíferos y levaduras y sistemas baculovirus. Las líneas celulares de mamíferos disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen las células de ovario de hámster chino, células HeLa, células de riñón de crías de hámster, células COS y muchas otras. Un hospedador bacteriano común y preferido es *E. coli*. Se pueden seleccionar o construir vectores adecuados que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluidas secuencias promotoras, fragmentos de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, víricos, p. ej., bacteriófagos o fagómidos, según sea apropiado. Hay constancia de muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica y análisis de proteínas.

Generalmente, el ácido nucleico que codifica un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación se proporciona como un aislado, en forma aislada y/o purificada, o exento o sustancialmente exento de contaminantes. Los ácidos nucleicos puede ser total o parcialmente sintéticos y pueden incluir ARN, ADNc o ADN genómico.

El ácido nucleico se puede proporcionar como parte de un vector replicable y la presente divulgación también proporciona un vector que incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido de CTLA-4 de la presente divulgación, particularmente cualquier vector de expresión a partir del cual se puede expresar el polipéptido codificado en condiciones apropiadas, y una célula hospedadora que contiene cualquier vector o ácido nucleico de este tipo. Un vector de expresión en este contexto es una molécula de ácido nucleico que incluye un ácido nucleico que codifica un polipéptido de interés y secuencias reguladoras apropiadas para la expresión del polipéptido, en un sistema de expresión *in vitro*, p. ej., un lisado de reticulocitos, o *in vivo*, p. ej., en células eucariotas tales como células COS o CHO o en células procariotas tales como *E. coli*.

Una célula hospedadora puede contener ácidos nucleicos según se describen en la presente. El ácido nucleico de la presente divulgación puede estar integrado en el genoma (p. ej., cromosoma) de la célula hospedadora. La integración puede promoverse mediante inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma de acuerdo con técnicas estándar. El ácido nucleico puede estar en un vector extracromosómico dentro de la célula.

El ácido nucleico se puede introducir en una célula hospedadora. La introducción, a la que generalmente se puede denominar (particularmente para la introducción *in vitro*), sin carácter limitante, "transformación" o "transfección", puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción utilizando retrovirus u otros virus, p. ej., virus de la variolovacuna o, para células de insectos, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección utilizando bacteriófagos.

Los genes marcadores tales como los de resistencia a antibióticos o genes de sensibilidad se pueden utilizar en la identificación de clones que contienen el ácido nucleico de interés, como es bien sabido en la técnica.

La introducción se puede seguir provocando o permitiendo la expresión del ácido nucleico, p. ej., cultivando células hospedadoras (que pueden incluir células que de hecho han sido transformadas aunque, más probablemente, las células descenderán de las células transformadas) en condiciones para la expresión del gen, de modo que se produzca el polipéptido codificado. Si se expresa el polipéptido acoplado con un péptido líder señal apropiado se puede secretar desde la célula en el medio de cultivo. Tras la producción por expresión, un polipéptido se puede aislar y/o purificar a

partir de la célula hospedadora y/o el medio de cultivo, según sea el caso, y utilizar posteriormente según se desee, p. ej., en la formulación de una composición que pueda incluir uno o más componentes adicionales, tales como una composición farmacéutica que incluya uno o más excipientes, vehículos o portadores farmacéuticamente aceptables (p. ej., consulte más adelante).

- 5 Un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación puede aislarse y/o purificarse (p. ej., utilizando un anticuerpo), por ejemplo, tras la producción por expresión a partir de un ácido nucleico codificante. Por lo tanto, se puede proporcionar un polipéptido de CTLA-4 exento o sustancialmente exento de contaminantes. Se puede proporcionar un polipéptido de CTLA-4 exento o sustancialmente exento de otros polipéptidos. El polipéptido de CTLA-4 aislado y/o purificado se puede utilizar en la formulación de una composición, que puede incluir al menos un componente adicional, por ejemplo, una composición farmacéutica que incluye un excipiente, vehículo o portador farmacéuticamente aceptables. Una composición que incluye un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación se puede utilizar en un tratamiento profiláctico y/o terapéutico tal como se ha discutido en otra parte en la presente.

15 En consecuencia, un aspecto de la presente divulgación es una composición que comprende o está constituida por un polipéptido de CTLA-4 de la presente divulgación, opcionalmente un polipéptido de CTLA-4 conjugado con la región Fc de IgG y uno o más excipientes farmacéuticos. En otra parte en la presente se describen numerosos ejemplos de polipéptidos de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación y cualquiera puede estar conjugado con una región Fc.

Por ejemplo, la composición puede comprender o estar constituida por:

20 un polipéptido de CTLA-4 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 43 (variante 1299), SEQ ID NO: 37 (variante 1322), SEQ ID NO: 38 (variante 1321), SEQ ID NO: 36 (variante 1315), SEQ ID NO: 42 (variante 1115) o la SEQ ID NO: 47 (variante 1227), conjugada con la secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG SEQ ID NO: 59; y

uno o más excipientes farmacéuticos.

La composición puede comprender o estar constituida por el polipéptido 1229 de CTLA-4-Ig codificado por el ácido nucleico depositado con el n.º de acceso NCIMB 41948 y uno o más excipientes farmacéuticos.

25 Por ejemplo, el polipéptido de CTLA-4 puede comprender la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15 o la SEQ ID NO: 16.

30 Una composición de acuerdo con la presente divulgación puede comprender un polipéptido de CTLA-4 con una concentración de al menos 70 mg/mL, p. ej., al menos 80 mg/mL, al menos 90 mg/mL o al menos 100 mg/mL. La concentración se calcula como la masa del polipéptido incluida la glucosilación e incluye la región Fc si está presente. La concentración del polipéptido se puede determinar por métodos estándar de medición espectrofotométrica utilizando un coeficiente de extinción basado en la masa calculada del polipéptido incluida la glucosilación (si está presente). Cuando la glucosilación está presente se asume que esta es completa. En los Ejemplos se ilustran métodos adecuados. Por ejemplo, se puede utilizar un coeficiente de extinción de 1.09 para determinar la concentración, tal como se ejemplifica para el 1299 de CTLA-4-Fc.

#### *Formulación y uso médico*

35 Los polipéptidos de CTLA-4 de la presente divulgación se pueden administrar mediante una administración mensual o menos frecuente. Generalmente, es deseable una frecuencia de administración menor para reducir la carga en pacientes y profesionales sanitarios, pero puede asociarse con un riesgo de menor eficacia terapéutica y/o una necesidad de incrementar la dosis del producto. Las mejoras en la potencia, afinidad y/o semivida de acuerdo con la presente divulgación reducen estos riesgos y ofrecen la posibilidad de una dosificación menor o menos frecuente en comparación con las pautas posológicas previas.

40 Para muchos pacientes, se requerirá tratamiento a lo largo de periodos de tiempo prolongados, p. ej., durante muchos años, y posiblemente durante el resto de vida del paciente. Por lo tanto, se prevé que se administren múltiples dosis. Los intervalos entre dosis pueden ser del orden de días, una semana o un mes. Preferentemente, la administración se produce a intervalos de al menos, o aproximadamente, 14, 21 o 28 días. Preferentemente, la administración a un paciente se produce por suministro subcutáneo con un intervalo de dosificación de 28 días o superior, p. ej., dosificación mensual.

45 La administración puede ser intravenosa o por cualquier otra vía de administración adecuada. Por ejemplo, el polipéptido de CTLA-4 se puede administrar por inyección subcutánea, facilitando la autoadministración por parte de los pacientes en su casa y ofreciendo la ventaja potencial de reducir las visitas del paciente al consultorio en comparación con las pautas posológicas intravenosas.

50 La formulación de CTLA-4 en volúmenes reducidos adecuados para la administración subcutánea requiere normalmente una concentración superior del producto de CTLA-4 en comparación con la formulación para la administración intravenosa. Normalmente, se prefieren concentraciones de al menos 70 mg/mL para la administración subcutánea, más preferentemente de al menos 100 mg/mL. La estabilidad mejorada de las composiciones de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación facilitan la formulación con una concentración más elevada, p. ej., para la administración subcutánea.



Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación, y para su uso de acuerdo con la presente divulgación, pueden incluir, además del principio activo, un excipiente, portador, tampón, estabilizantes u otros materiales farmacéuticamente aceptables muy conocidos por los expertos en la técnica. Tales materiales deben ser atóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del portador o de otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser cualquier vía adecuada, pero más probablemente la inyección (con o sin aguja), especialmente la inyección subcutánea. Otras vías de administración preferidas incluyen la administración por inhalación o la administración intranasal.

Para la inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que está exenta de pirógenos y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos expertos en la técnica son muy capaces de preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como la inyección de cloruro de sodio, la solución de Ringer o la solución de lactato de Ringer. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario.

Se puede utilizar un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación en un método de diagnóstico o tratamiento del cuerpo humano o animal, preferentemente humano.

Los métodos de tratamiento pueden comprender la administración de un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación, p. ej., la administración de una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de CTLA-4. Se puede utilizar una composición o polipéptido de CTLA-4 que comprende un polipéptido de CTLA-4 tal como se describe en la presente para su uso en un método de tratamiento de un paciente por administración subcutánea o intravenosa.

Se puede administrar a un individuo un polipéptido de CTLA-4, preferentemente por administración en una "cantidad profilácticamente eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" (según sea el caso, aunque la profilaxis se puede considerar terapia), siendo esta suficiente para mostrar un beneficio en el individuo. La cantidad real administrada, y la tasa y evolución temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando. La prescripción del tratamiento, p. ej., decisiones sobre la dosificación, etc., es parte de la responsabilidad de los facultativos generales y otros médicos.

Se puede administrar una composición sola o combinada con otros tratamientos, ya sea simultánea o secuencialmente dependiendo de la afección que se esté tratando.

Los polipéptidos de CTLA-4 son útiles para atenuar la respuesta de linfocitos T y, por lo tanto, se puede utilizar para tratar afecciones en las que la atenuación de la respuesta de linfocitos T sea beneficiosa. Las indicaciones clínicas en las que se puede utilizar un polipéptido de CTLA-4 para proporcionar un beneficio terapéutico incluyen las enfermedades autoinmunitarias y/o las enfermedades inflamatorias. Los ejemplos de indicaciones terapéuticas son la artritis reumatoide (RA), artritis juvenil, artritis psoriática, psoriasis, esclerosis múltiple, asma, enfermedad de Crohn, nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, rechazo del trasplante, diabetes de tipo I, síndrome de Sjögren y colitis ulcerosa, así como otras afecciones autoinmunitarias tales como la alopecia. Se considera que los polipéptidos de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación son particularmente adecuados para los pacientes con una RA de moderada a grave.

Los pacientes tratados con polipéptidos de CTLA-4 o composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente divulgación pueden ser aquellos con RA de moderada a gravemente activa a pesar de un tratamiento previo o en curso con fármacos antirreumáticos modificantes de la enfermedad sintéticos (DMARD, por sus siglas en inglés) o con compuestos biológicos que no son CTLA-4, p. ej., que no son Abatacept. Se puede utilizar un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la presente divulgación para tratar pacientes por monoterapia, de manera combinada con DMARD convencionales en pacientes con respuestas inadecuadas a los DMARD convencionales, o en pacientes con insuficiencia biológica.

Se puede monitorizar la eficacia del tratamiento y se pueden obtener datos sobre la evolución del daño articular y/o la función del paciente.

### **Ejemplos**

Se ha depositado la siguiente secuencia de CTLA4-Ig con NCIMB:

*Escherichia coli* DH5a Variante 1299 = NCIMB 41948

Fecha del depósito = 13 de marzo de 2012

La estrategia utilizada para optimizar la potencia biológica de la molécula de fusión CTLA-4 región Fc consistió en dos actividades principales. Una actividad fue utilizar la presentación de ribosomas para realizar la evolución dirigida del dominio CTLA-4 para seleccionar una afinidad mejorada hacia los ligandos CD80 y CD86, así como también una estabilidad mejorada de ese dominio. Los resultados de las selecciones de presentación de ribosomas, que consistían en poblaciones diversas de variantes de CTLA-4, se secuenciaron y aquellas que codificaban secuencias únicas se expresaron con una pareja para la fusión con la región Fc para el estudio directamente en ensayos de estimulación de

linfocitos T *in vitro*. La ventaja de esta estrategia fue clasificar muchas variantes diferentes de CTLA-4 (se estudiaron > 1000) en un formato similar al fármaco, es decir, en el contexto de un dominio Fc que promueve la dimerización, en un ensayo biológicamente relevante. Una característica adicional de esta estrategia fue realizar combinaciones de aquellas mutaciones de CTLA-4 que estuvieron asociadas con una función biológica mejorada, con el fin de lograr ganancias adicionales en la potencia, a través de la sinergia.

Esta estrategia fue capaz de seleccionar simultáneamente variantes de CTLA-4 con una afinidad superior y la estabilidad proteica. Las selecciones de la afinidad emplean concentraciones decrecientes del ligando diana, en este caso CD80/86, para enriquecer de manera selectiva variantes de CTLA-4 con una afinidad superior. Las selecciones de la estabilidad mejorada utilizan ya sea un agente desestabilizante tal como DTT, o microesferas de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) para eliminar del grupo de selección aquellas variantes que son menos capaces de plegarse o tienen menor tendencia a ello. Por lo tanto, se podría aplicar la presión de afinidad y estabilidad dentro de una única selección, más que llevar a cabo estrategias paralelas.

La segunda actividad fue la modificación racional del dominio Fc para introducir mutaciones de las que hay constancia que eliminan las funciones efectoras mediadas por la región Fc y para incrementar la semivida circulante de la molécula *in vivo*. Se prepararon diferentes variantes de las regiones Fc como compuestos de fusión con CTLA-4 y se estudiaron en estudios acelerados *in vitro* de estabilidad para seleccionar la región Fc con el perfil de estabilidad óptimo.

Tras estas dos actividades paralelas y el cribado posterior, los dominios de CTLA-4 más potentes, según se midió mediante la inhibición en los ensayos múltiples de estimulación de linfocito T *in vitro*, se combinaron con el dominio Fc modificado más estable, según se midió por los estudios acelerados *in vitro* de estabilidad. Un estudio adicional *in vitro* para determinar la potencia biológica y la estabilidad proteica permitió la clasificación relativa de las moléculas en el formato farmacológico final.

#### Ejemplo 1. Construcción de una colección de variantes de CTLA-4 y selección por presentación de ribosomas de una estabilidad y potencia mejoradas

Se realizó la presentación de ribosomas en un dominio de CTLA-4 humano monomérico, que correspondía a la entrada Swiss-Prot P16410, residuos 38-161 del dominio extracelular, sin añadir una región Fc. Esta secuencia (SEQ ID NO: 35) también se denomina CTLA-4 de tipo natural. Se obtuvo el constructo de presentación de ribosomas CTLA-4 clonando la porción requerida del ADNc CTLA-4 humano en un vector que contenía los elementos reguladores 5' y 3' que se requieren para la presentación de ribosomas (Hanes *et al.*, *Meth. Enzymol.* (2000) 328:404). Este constructo comprende una secuencia promotora de la RNA polimerasa T7 seguida por un sitio de unión ribosómico procariota (secuencia Shine-Dalgarno) en dirección 5' respecto a la secuencia codificante de CTLA-4. La cisteína del aminoácido 120 (o posición 157 de acuerdo con la numeración en la entrada P16410 de Swiss-Prot) en la interfaz de dimerización del CTLA-4 humano se mutó en una serina para prevenir la dimerización de moléculas de CTLA-4 en el formato de presentación de ribosomas que de otra manera podrían interferir con la selección de secuencias de CTLA-4 mejoradas. En dirección 3' respecto a la secuencia de CTLA-4, se incluyó una porción de la proteína del gen III del fago filamentoso para actuar como un espaciador que permitiera que las variantes de CTLA4 se presentaran fuera del túnel ribosómico. El constructo de presentación de ribosomas de CTLA-4 también contuvo secuencias en 5' y 3' en horquilla en el nivel de ARNm para ayudar a estabilizar las colecciones de ARNm frente a la degradación por nucleasas.

#### *Colecciones propensas a errores*

El constructo de presentación de ribosomas de CTLA-4 humano descrito anteriormente se utilizó como molde sobre el cual generar una colección de variantes aleatorias utilizando PCR propensa a errores. Se aplicó PCR propensa a errores al gen de CTLA-4 utilizando el kit de mutagénesis aleatoria por PCR Diversify (Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se adaptaron las reacciones para que proporcionaran un promedio de cuatro mutaciones de aminoácidos por molécula y una colección de aproximadamente  $2.5 \times 10^{10}$  moléculas variantes. Este procedimiento de mutagénesis aleatoria se incorporó adicionalmente en el proceso de selección donde se aplicó al resultado de la tercera ronda de selección con el fin de introducir más diversidad sobre la población enriquecida de moléculas de unión, antes de una selección adicional.

#### *Colección dirigida "Bucle4"*

También se utilizó el constructo de presentación de ribosomas de CTLA-4 humano como un molde sobre el cual generar una colección de variantes con una mutagénesis dirigida a la región de la molécula de CTLA-4 con el potencial de contribuir a la interacción con CD80 y CD86. La estructura cocrystalina del complejo CTLA-4 humano:CD80 humano (Base de datos de proteínas (PDB, por sus siglas en inglés): 1I8L) y el complejo CTLA-4 humano:CD86 humano (PDB: 1I85) se examinó para visualizar la interacción de unión entre las moléculas, en particular las cadenas laterales de aminoácidos de CTLA-4 muy cercanas a los ligandos. Se ha observado que una región de la proteína de CTLA-4 humana (SEQ ID 35) que comprende las posiciones de aminoácidos 59-65 (o posiciones 96-102 de acuerdo con la numeración SwissProt del CTLA-4 de la entrada P16410) forma un bucle que se extiende en la dirección de CD80 y CD86. Cada uno de los residuos de esta región se aleatorizó totalmente utilizando mutagénesis de saturación (NNS) para crear una colección de aproximadamente  $3.4 \times 10^{10}$  moléculas variantes. Esta colección "Bucle4" se construyó mediante técnicas estándar utilizando oligonucleótidos que se superponían (SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34).

*Selección de una afinidad y estabilidad mejoradas*

La selección de una unión mejorada de variantes de CTLA-4 humano a CD80 y CD86 humanos se llevó a cabo utilizando selecciones basadas en la afinidad de presentación de ribosomas tal como se describe en Hanes *et al.* (Meth. Enzymol. (2000) 328:404). Resumiendo, se transcribieron las colecciones de ADN de la variante de CTLA-4 y a continuación se tradujeron en un sistema de traducción procariota, exento de células y se detuvieron las reacciones de traducción para generar complejos de selección de presentación de ribosomas ternarios (ARNm-ribosoma-proteína) que se incubaron a continuación con proteínas de fusión de la región Fc con CD80 humano o CD86 humano (R&D Systems). Los complejos con CD80 o CD86 unido se capturaron por incubación con microesferas magnéticas recubiertas con proteína G (Dyna) y se recuperaron los complejos terciarios unidos por separación magnética mientras los complejos no unidos se eliminaron con lavados. El ARNm que codifica las variantes de CTLA-4 unidas se recuperó por transcripción inversa y PCR. Para impulsar la selección de las variantes de CTLA-4 con una unión mejorada, se repitió el proceso de selección utilizando concentraciones decrecientes de CD80 o CD86 a lo largo de varias tandas.

Junto con la selección de una afinidad mejorada hacia CD80 y CD86, los grupos de variantes de CTLA-4 se procesaron simultáneamente para seleccionar mediante presentación de ribosomas aquellos con una estabilidad mejorada. En las tandas tempranas de la selección (tandas 1 y 3) se utilizó DTT para aplicar una presión de selección que favoreciera la recuperación de las variantes de CTLA-4 más estables (Jermutus *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2 de enero de 2001;98(1):75-80). Se incluyó una concentración final de DTT de 0.5 mM en la reacción de traducción, tras lo cual se incubó la reacción con una pasta de microesferas de sefarosa de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (GE Healthcare), también en presencia de un 0.5 mM de DTT. Se utilizó el paso de HIC para capturar las variantes con un plegamiento deficiente y eliminarlas de la reacción por centrifugación, antes de la incubación con CD80 y la selección de afinidad tal como se ha descrito anteriormente.

*Colección de mutagénesis de puntos de hipermutabilidad y recombinación racional de mutaciones clave*

Tras el cribado inicial de variantes de CTLA-4 a partir de las colecciones dirigidas por PCR propensa a errores y Bucle4, se identificaron las mutaciones asociadas con una actividad mejorada y se utilizaron para diseñar más variantes de CTLA-4. En una estrategia, se construyó una colección de mutagénesis en puntos de hipermutabilidad en la que las posiciones 16, 25, 58, 70, 85 y 93 de la SEQ ID NO: 35 (o las posiciones 53, 62, 95, 107, 122 y 130 de acuerdo con la numeración SwissProt del CTLA-4 de la entrada P16410) se aleatorizaron por completo en una colección única utilizando mutagénesis de saturación (NNS). Se creó la colección utilizando oligonucleótidos mutagénicos y que se superponían (SEQ ID NO: 61-SEQ ID NO: 67 inclusive). A continuación se procesó la colección para seleccionar la afinidad mejorada tal como se ha descrito anteriormente.

En una estrategia alternativa, un número más pequeño de mutaciones identificadas a partir de las colecciones propensas a error, Bucle4 y de mutagénesis de puntos de hipermutabilidad, que se asociaron con una actividad mejorada, se combinaron por mutagénesis dirigida por oligonucleótidos para crear recombinantes racionales que se estudiaron a continuación directamente para determinar su actividad biológica. Las mutaciones escogidas para esta estrategia fueron: I16S, S25N, S25P, G27S, M54K, N56S, L58G, T59S, F60T, L61Q, L61P, D62G, D63Y, S64P, I65N, I65V, S70A, Q80R, M85S y K93Q (o, numeradas de acuerdo con el CTLA-4 de Swiss-Prot entrada P16410: I53S, S62N, S62P, G64S, M91K, N93S, L95G, T96S, F97T, L98Q, L98P, D99G, D100Y, S101P, I102N, I102V, S107A, Q117R, M122S y K130Q).

Ejemplo 2. Expresión de CTLA-4 de tipo natural y variantes como proteínas de fusión con la región Fc

Se clonaron en el vector pEU7.1 genes de CTLA-4 variantes a partir de las selecciones de la presentación de ribosomas. Este vector permite la expresión del gen CTLA-4 como una fusión en fase con una región Fc de IgG1 (SEQ ID NO: 56). Los resultados de la presentación de ribosomas se amplificaron por PCR y se clonaron en pEU7.1 antes de la transformación en células DH5-alfa de *E. coli*. Los oligonucleótidos utilizados para la clonación por PCR también se diseñaron para que la serina en la posición 120 revirtiera (residuo 157 de acuerdo con la numeración en la entrada P16410 de Swiss-Prot) en la cisteína que es el aminoácido de tipo natural. Tras la secuenciación de los transformantes individuales, se seleccionaron para la expresión de proteínas un total de más de 1000 variantes con secuencias de aminoácidos de CTLA-4 únicas. En lotes de 88 variantes, se purificó el ADN plasmídico codificante siguiendo los protocolos del proveedor (Qiagen) y se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm de modo que la concentración de ADN se pudiera utilizar para calcular la cantidad correcta de ADN para la transfección.

*Expresión, purificación y cuantificación de las proteínas de CTLA-4 de placas de 24 pocillos*

Se sembraron 3 mL de células de ovario de ratón chino (CHO) (ECACC) con una concentración de 1 millón de células por mL en pocillos separados en una placa de 24 pocillos (Whatman 734-2558) en medio CD-CHO (Invitrogen 10743-029) que contenía sulfoximina de L-metionina 25 µM (Sigma M5379). Las placas de 24 pocillos que contenían las células se sellaron con una tapa tipo sándwich respirable (Applikon biotechnology, Z365001224) y se colocaron en una abrazadera para placas con pocillos profundos (Applikon biotechnology, Z365001700). Se agitaron las células a 250 rpm, 80% de humedad, 5% de CO<sub>2</sub> y 37 °C. Para la transfección, se mezclaron 50 µL de NaCl 150 mM que contenían 3 µg de ADN plasmídico con 50 µL que contenían 21 µg de PEI de 25 kDa lineal (Polysciences, 23966). El complejo formado ADN-PEI se añadió a las células, y no se permitió que transcurrieran más de 15 minutos entre el comienzo de la formación del complejo y la adición a las células. Entre 16 y 24 horas tras la transfección, se nutrieron las células añadiendo 300

5  $\mu\text{L}$ /pocillo de CD-CHO EfficientFeed B para (Invitrogen A10240). Se agitaron las placas a 250 rpm, 80% de humedad, 5% de  $\text{CO}_2$  y 37 °C durante 5-6 días más para permitir la expresión de la proteína en el medio de cultivo. Tras la expresión, el medio de cultivo agotado que contenía la proteína se aclaró centrifugando a 3000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes aclarados (1.2 mL) se redistribuyeron en una placa de 96 pocillos con filtro (3M Empore, 12146036) utilizando el robot de manipulación de líquidos Freedom Evo® (Tecan). Se eliminaron los desechos celulares residuales por filtración utilizando una bomba de vacío y un colector de vacío 6S QIAvac (Qiagen). Se procesaron 1.8 mL de sobrenadante aclarado y filtrado para la purificación realizada en un robot de manipulación de líquidos Minitrack (RTM) (Perkin Elmer) utilizando columnas de afinidad con la proteína A PhyTip (RTM) (Phynexus, PTP-92-20-01), volumen de lecho de resina de 20  $\mu\text{L}$ . Se acondicionaron las columnas PhyTip (RTM) mediante 500  $\mu\text{L}$  de NaP 20 mM, pH 7.0. A 10 continuación se cargaron las columnas PhyTip (RTM) haciendo pasar sobre ellas los sobrenadantes crudos en lotes de 6x300  $\mu\text{L}$ , se lavaron con 200  $\mu\text{L}$  D-PBS, 200  $\mu\text{L}$  de NaP 20 mM pH 7.0, se eluyeron con 120  $\mu\text{L}$  de HEPES 100 mM, NaCl 140 mM, pH3 y se neutralizaron con 20  $\mu\text{L}$  de HEPES 1M, pH 8.0.

15 Se transfirieron las proteínas purificadas a una placa de 96 pocillos de polipropileno negro (Greiner, 655209) seguido por la adición de 145  $\mu\text{L}$  de PBS, 0.02% de Tween20, 1 mg/mL de BSA, 0.05% de tampón de azida de sodio (tampón Octet). Se generó una curva estándar utilizando una proteína de fusión CTLA-4 de tipo natural con la región Fc purificada previamente en un tampón idéntico. Se preparó un conjunto de concentraciones estándar en la placa de polipropileno negro en un volumen de 150  $\mu\text{L}$  con una concentración de partida de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y diluciones 1:3. Utilizando un Octet RED con biosensores recubiertos con proteína A (ForteBio Inc, 18-0004) se realizó la cuantificación utilizando un tiempo de lectura de 120 segundos con un caudal de 200 rpm. Se utilizó una columna de 8 biosensores para cada placa de 96 20 pocillos con muestras. Se regeneraron los biosensores añadiendo 200  $\mu\text{L}$  de glicina 10 mM pH 1.7 (Sigma, G-7403) en la placa de 96 pocillos. Se neutralizaron los biosensores antes de procesar las siguientes muestras añadiendo 200  $\mu\text{L}$  de tampón Octet. Se realizaron 3 ciclos de regeneración/neutralización con un tiempo de 30 s y un caudal de 200 rpm. Se determinaron concentraciones de muestras desconocidas por comparación de tasas de unión entre la curva patrón y la muestra desconocida utilizando el paquete de software de análisis de datos Octet RED.

#### 25 *Expresión, purificación y cuantificación de las proteínas de CTLA-4 a mayor escala*

Para las preparaciones a mayor escala de proteínas de CTLA-4 individuales como compuestos de fusión con la región Fc, se aplicaron los mismos pasos generales, tal como se utilizaron para el método de la placa de 24 pocillos. Los plásmidos que contenían la variante del gen de CTLA-4 como una fusión en fase con la región Fc de IgG1 se prepararon a partir de células de *E. coli*. Para la preparación de proteínas a una escala >100 mg, se preparó el constructo completo 30 que contenía el gen CTLA-4 directamente en fase con el gen de la región Fc de IgG1 por síntesis génica. En todos los casos, se preparó el ADN plasmídico que codificaba la proteína de interés y se transfirió en células CHO para su expresión. En lugar de las placas de 24 pocillos, se cultivaron volúmenes de células más grandes en frascos de cultivo tisular o bolsas para agitación en oleadas antes de la purificación a partir de los sobrenadantes del cultivo. Se combinaron las recolecciones y se filtraron antes de la purificación por cromatografía con la proteína A. Se cargaron los sobrenadantes 35 del cultivo en una columna del tamaño adecuado con proteína A cerámica (BioSeptra) y se lavaron con Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, NaCl 250 mM. Se eluyó de la columna la IgG unida utilizando citrato de sodio 0.1 M (pH 3.0) y se neutralizó por adición de Tris-HCl (pH 9.0). Se intercambió el tampón del material eluido por PBS utilizando columnas Nap10 (GE, 17-0854-02) y se determinó la concentración de IgG espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción basado en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Se analizaron las proteínas purificadas para determinar la agregación o 40 degradación utilizando SEC-HPLC y SDS-PAGE.

#### Ejemplo 3. Actividad biológica de variantes de CTLA-4 en un ensayo celular dual en células Raji (linfocitos B) y células Jurkat (linfocitos T)

La estrategia de cribado descrita en la presente incluyó medidas de la actividad biológica de más de 1000 variantes de CTLA-4, expresadas con una pareja para la fusión con la región Fc, en un ensayo de estimulación de linfocitos T *in vitro*. 45 Las variantes de CTLA-4 procedentes de todas las diferentes estrategias de mutagénesis (incluida la PCR propensa a error, mutagénesis dirigida, recombinación en puntos de hipermutabilidad y recombinación racional) se estudiaron para determinar la actividad biológica y se clasificaron de acuerdo con su actividad biológica respecto al CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35), también expresada en un formato de fusión con la región Fc.

Para determinar la actividad biológica de las variantes de CTLA-4, se añadieron muestras a un ensayo celular dual 50 constituido por células Raji (linfocitos B) y Jurkat (linfocitos T). La interacción de CD28, expresado por células Jurkat, con los ligandos CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) expresados en células Raji, combinada con una señal de coactivación para el receptor de linfocitos T (tal como PHA (fitohemaglutinina)) provoca una liberación de interleucina-2 (IL-2) desde las células Jurkat. El CTLA-4 soluble se puede unir a los ligandos CD80 y CD86, bloquea así su interacción con CD28 y atenúa su respuesta. Por lo tanto, la potencia de los clones de CTLA-4 Ig está determinada por la inhibición de la liberación de IL-2 55 desde los linfocitos T tal como se mide en un ensayo IL-2 HTRF (CisBio 64IL2PEC).

Se utilizaron placas de 384 pocillos con una unión a proteínas baja (Greiner # 781280) para realizar once diluciones en serie de 1 en 3 de las muestras de estudio que se llevaron a cabo en medio de cultivo completo (RPMI 1640 Glutamax, 60 Invitrogen n.º 61870, 10% de FBS, 1% de penicilina /estreptomicina, Invitrogen n.º 15140). Todas las diluciones de las muestras se llevaron a cabo por duplicado comenzando con una concentración de muestra superior de 5-30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en las células.

## ES 2 777 778 T3

Las células Raji y Jurkat en suspensión se transfirieron de los frascos a viales de centrifuga y se centrifugaron a 240g durante 5 minutos. Ambas líneas celulares se resuspendieron con una concentración de 750 000 células/mL en medio de cultivo y cada una se colocó en una placa de 384 pocillos Maxisorp (Nunc 464718) en una cantidad de 0.02 mL/pocillo (=15 000 células/línea celular/pocillo). Se transfirieron 0.02 mL desde las placas con la dilución de la muestra a las placas con células y se añadieron 0.02 mL de PHA 40 µg/mL (Sigma n.º L-1668) (o 0.02 mL de medio en los pocillos de control negativo) a todos los otros pocillos para obtener una concentración final de 10 µg/mL y se incubaron a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Después de 20-24 horas, se recolectaron los sobrenadantes celulares y se midió la secreción de IL-2 utilizando un kit IL-2 HTRF comercial (CisBio 64IL2PEC). Resumiendo, se preparó una "mezcla maestra" de anti-hIL-2 criptato (donante fluoróforo) y anti-hIL-2 d2 (aceptor fluoróforo) diluyendo 1/200 en tampón conjugado recién preparado (0.2% de BSA / KF 0.8 M /PBS). Se trazó una curva patrón de ocho puntos utilizando IL-2 (n.º NIBSC 96/504) diluida 1 en 2 en medio con una concentración superior de 2 ng/mL. Se mezclaron volúmenes idénticos de la mezcla maestra de reactivos y las muestras se mezclaron en una placa de ensayo de 384 pocillos de volumen pequeño (Costar 3676) y se incubaron 3-168 horas a temperatura ambiente. Se leyeron las placas con un Envision (Perkin Elmer) utilizando una longitud de onda de excitación de 320 nm y longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm.

Se calcularon los valores de unión específica y Delta F porcentuales para cada pocillo tal como sigue:

$$\% \text{ de Delta F} = \frac{(\text{proporción de la muestra A665/A620} - \text{proporción de NSB de A665/A620}) \times 100}{(\text{proporción de NSB de A665/A620})}$$

$$\% \text{ de unión específica} = \frac{(\% \text{ de Delta F de la muestra} - \% \text{ de Delta F de NSB}) \times 100}{(\% \text{ de Delta F total} - \% \text{ de Delta F de NSB})}$$

Los pocillos solo con medio (min/unión no específica (NSB, por sus siglas en inglés)) se utilizaron como fondo y los pocillos solo con PHA (max/total) se utilizaron para determinar la señal máxima de los ensayos. Los resultados se analizaron utilizando el software Graphpad Prism (v5.01) y se determinaron las concentraciones CI<sub>50</sub> utilizando un modelo de ajuste a la curva de regresión no lineal (log [inhibidor] vs respuesta con pendiente variable) utilizando el método de ajuste de mínimos cuadrados.

La siguiente tabla resume el número de moléculas variantes de CTLA-4 catalogadas entre las que tienen una mejora significativa en la potencia biológica respecto al CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35), también expresada en un formato de fusión con la región Fc:

Estrategia de mutagénesis	Número de variantes de CTLA-4 con una actividad biológica mejorada significativa <i>versus</i> CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35) en un formato de fusión con la región Fc
Colección de PCR propensa a errores	50
Colección dirigida "Bucle4"	1
Colección del punto de hipermutabilidad	21
Recombinante racional	35
TOTAL	107

Tras el estudio repetido de estas 107 variantes de CTLA-4, se determinaron medidas precisas de CI<sub>50</sub> y se calculó el factor de mejora respecto al CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35) en un formato de fusión con la región Fc. La siguiente tabla resume estos datos para algunas de las variantes de CTLA-4 más potentes para cada una de las estrategias de mutagénesis.

Nombre de la variante de CTLA-4	SEQ ID NO	Estrategia de optimización	CI <sub>50</sub> del ensayo celular dual Raji/Jurkat (nM)	Factor de mejora respecto al tipo natural (SEQ ID NO: 35)

ES 2 777 778 T3

Tipo natural	35	NA	29.80	1
Variante 1315	36	Recombinante racional	0.24	123
Variante 1322	37	Recombinante racional	0.33	91
Variante 1321	38	Recombinante racional	0.44	68
Variante 0943	39	Recombinante racional	0.54	56
Variante 0898	40	Recombinante racional	0.60	50
Variante 1319	41	Recombinante racional	0.78	38
Variante 1115	42	Colección del punto de hipermutabilidad	0.44	67
Variante 1299	43	Colección del punto de hipermutabilidad	0.53	56
Variante 1249	44	Colección del punto de hipermutabilidad	0.69	43
Variante 1303	45	Colección del punto de hipermutabilidad	0.93	32
Variante 1114	46	Colección del punto de hipermutabilidad	1.40	21
Variante 1227	47	Colección del punto de hipermutabilidad	1.60	19
Variante 0722	48	Colección propensa a errores	1.07	28
Variante 0645	49	Colección propensa a errores	1.24	24
Variante 0636	50	Colección propensa a errores	1.26	24
Variante 0745	51	Colección propensa a errores	1.36	22
Variante 0673	52	Colección propensa a errores	1.38	22
Variante 0788	53	Colección propensa a errores	1.60	19
Variante 0701	54	Colección propensa a errores	1.61	19
Variante 0439	55	Colección dirigida "Bucle4"	1.20	25

Las secuencias de estas variantes de CTLA-4 se muestran en la Figura 1A.

Los perfiles de  $CI_{50}$  de 6 de las variantes de CTLA-4 más potentes y del CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35) en el formato de fusión con la región Fc en el ensayo celular dual Raji-Jurkat se muestran en la Figura 3A.

5 Ejemplo 4. Actividad biológica de variantes de CTLA-4 en un ensayo celular dual en células Raji (linfocitos B) y linfocitos T CD4+ humanos primarios

10 Se recogió sangre humana en tubos de recogida CPT Vacutainer (BD Biosciences) y se añadieron 400  $\mu$ L del reactivo de purificación RosetteSep CD4+ (Stem Cell Technologies). Tras una incubación de 20 minutos, se centrifugaron los tubos a 1700g durante 25 minutos. Las células se recogieron y se transfirieron a un tubo cónico de 50 mL y se sedimentaron por centrifugación a 350g durante 10 minutos. Se lisaron los eritrocitos resuspendiéndolos en 20 mL de reactivo Vitalize y se incubaron entre 30 minutos y 1 hora. A continuación se sedimentaron las células por centrifugación a 350g durante 10 minutos y se lavaron una vez con medio para linfocitos T (medio Xvivo-15 (Lonza) suplementado con un 1% de Anti/Anti (Invitrogen)). Se prepararon un millón de células por mL de suspensión de células Raji y linfocitos T CD4+ humanos primarios en medio para linfocitos T completo y se guardaron por separado hasta que estuvieron a punto para ser añadidos a la placa de ensayo de 96 pocillos. En una placa de 96 pocillos separada (con una unión a proteínas baja), se realizaron diluciones de moléculas variantes de CTLA-4 en medio para linfocitos T completo comenzando con una concentración inicial de 100  $\mu$ g/mL y haciendo doce diluciones en serie 1:5. Se dispensaron 100  $\mu$ L de cada una de las concentraciones

de la variante de CTLA-4 a la placa de ensayo de 96 pocillos tratada para cultivo tisular. Se mezclaron las suspensiones de células Raji y de linfocitos T CD4+ humanos en una proporción 1:1 y se añadió un anticuerpo anti-CD3 (clon UCHT1 (BD Bioscience)) hasta una concentración final de 10 µg/mL. Se dispensaron 100 µL de suspensión celular en cada pocillo que contenía las variantes de CTLA-4 y se incubaron durante 28-24 horas. A continuación se recolectaron las placas por centrifugación a 350g durante 5 minutos y se transfirieron los sobrenadantes a una placa de 96 pocillos nueva. Se midió la secreción de IL-2 utilizando un kit para IL-2 humana Duoset de acuerdo con el protocolo del fabricante (R&D Systems).

Una comparación de la potencia con el CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35) en un formato de fusión con la región Fc en el ensayo de linfocitos T CD4+ humanos primarios para 6 de las variantes de CTLA-4 más potentes se muestra en la Figura 3B.

#### 10 Ejemplo 5. Actividad biológica de variantes de CTLA-4 en una reacción mixta de linfocitos utilizando células mononucleares sanguíneas periféricas procedentes de mono cinomolgo

Se recogió sangre de mono cinomolgo procedente de dos animales diferentes en un tubo de recogida CPT Vacutainer (BD Biosciences) y se sedimentó por centrifugación a 1700g durante 25 minutos. Las células se recogieron y se transfirieron a un tubo cónico de 50 mL y se sedimentaron por centrifugación a 350g durante 10 minutos. Se lisaron los eritrocitos resuspendiéndolos en 20 mL de reactivo Vitalize y se incubaron entre 30 minutos y 1 hora. A continuación se sedimentaron las células por centrifugación a 350g durante 10 minutos y se lavaron una vez con medio para linfocitos T (medio Xvivo-15 (Lonza) suplementado con un 1% de Anti/Anti (Invitrogen)). En una placa de 96 pocillos separada (con una unión a proteínas baja), se realizaron diluciones de moléculas variantes de CTLA-4 en medio para linfocitos T completo comenzando con una concentración inicial de 100 µg/mL y haciendo doce diluciones en serie 1:5. Se dispensaron 100 µL de las diluciones de CTLA-4 Ig en la placa de ensayo de 96 pocillos tratada para cultivo tisular. Se mezclaron suspensiones de células PBMC procedentes de cada animal en una proporción 1:1 y se dispensaron 100 µL de la suspensión celular en todos los pocillos que contenían las diluciones de CTLA-4 Ig y se incubaron durante 24 horas. A continuación se recolectaron las placas por centrifugación a 350g durante 5 minutos y se transfirieron los sobrenadantes a una placa de 96 pocillos nueva. Se midió la secreción de IL-2 utilizando un kit para IL-2 cinomolgo ELISA de acuerdo con el protocolo del fabricante (MABTech).

Una comparación de la potencia con el CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35) en un formato de fusión con la región Fc en el ensayo de reacción mixto de linfocitos de mono cinomolgo para dos de las variantes de CTLA-4 más potentes se muestra en la Figura 3C.

#### Ejemplo 6. Especificidad de la unión de la variante a CD80 y CD86

30 Se marcaron las variantes de CTLA-4 con peroxidasa de rábano utilizando el kit de marcaje con HRP activada (Pierce). Se recubrieron proteínas de fusión de dominios extracelulares de los miembros de la familia B7 con la región Fc (R&D Systems) durante toda la noche con concentraciones de 5 µg/mL en PBS en una placa Maxisorp (Nunc). Las placas se bloquearon con un BSA al 1%, las variantes de CTLA-4 marcadas con HRP se añadieron con diferentes concentraciones y se determinó la cantidad de proteína unida utilizando un sustrato colorimétrico (sustrato BD OptEIA, BD Biosciences).

35 La especificidad por CD80 y CD86 de dos de las variantes de CTLA-4 más potentes en comparación con otros ligandos proteicos relacionados se muestra en la Figura 4.

#### Ejemplo 7. Análisis de funciones efectoras mediadas por la región Fc

##### *Ensayo de citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés)*

40 Se recogió sangre humana en un tubo de recogida CPT Vacutainer (BD Biosciences) y se sedimentó por centrifugación a 1700g durante 25 minutos. Las células se recogieron y se transfirieron a un tubo cónico de 50 mL y se sedimentaron por centrifugación a 350g durante 10 minutos. Se lisaron los eritrocitos resuspendiéndolos en 20 mL de reactivo Vitalize y se incubaron entre 30 minutos y 1 hora. A continuación se sedimentaron las células por centrifugación a 350g durante 10 minutos y se lavaron una vez con medio para linfocitos T (medio Xvivo-15 (Lonza) suplementado con un 1% de Anti/Anti (Invitrogen)). Se colocaron en placas 500 000 PBMC en 200 µL de medio Xvivo-15 en presencia de diferentes anticuerpos y proteínas de fusión con la región Fc. Tras 24 horas de incubación, se determinó la viabilidad de linfocitos B utilizando citometría de flujo por tinción con anticuerpos anti-CD19 (BD Biosciences) y 7-AAD (Molecular Probes). Se calculó para cada muestra el número de linfocitos B viables multiplicando por 500 000 el porcentaje de células en la sección de viabilidad por las propiedades de dispersión frontal/lateral que fueron también CD19+ y 7-AAD-.

##### *Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés)*

50 Se recogió suero humano en tubos separadores de suero y se añadió a medio Xvivo-15 hasta una concentración final de un 10% p/v. Se incubaron 100 000 linfocitos B Raji durante 18 horas en medio que contenía diversos anticuerpos y proteínas de fusión con la región Fc. Se determinó la viabilidad de las células Raji utilizando citometría de flujo por tinción con 7-AAD (Molecular Probes). Se calculó para cada muestra el número de células viables multiplicando por 100 000 el porcentaje de células en la sección de viabilidad por las propiedades de dispersión frontal/lateral que fueron también 7-AAD-. Se utilizó como control medio que contenía suero humano que se había inactivado con anterioridad térmicamente durante 30 minutos a 56 °C para confirmar la citotoxicidad celular mediada por el complemento. En la Figura 5 se muestra

una demostración de la función efectora nula (ADCC y CDC) para dos de las variantes de CTLA-4 más potentes con una modificación TM.

Ejemplo 8. Análisis cinéticos de la unión de variantes de CTLA-4 a CD80 y CD86 humano, murino y de mono cinomolgo

*Clonación y expresión de reactivos de tipo CD80 y CD86*

5 Se sintetizaron moléculas de ADNc que codificaban los dominios extracelulares (ECD, por sus siglas en inglés) de CD80 y CD86 procedentes de seres humanos y ratones por clonación mediante PCR con extensión del cebador y se clonó en pDONR221 (Invitrogen, N.º de cat. 12536-017). Se utilizaron secuencias de bases de datos para CD80 y CD86 humanos y murinos (remítase a la tabla 1). No se dispuso de secuencias de mono cinomolgo, de modo que, basándose en la elevada homología predicha entre mono cinomolgo y mono rhesus, se utilizaron las secuencias del CD80 de mono rhesus  
 10 (número de acceso ensemble ENSMMUG00000016367) y el CD86 (número de acceso ensemble ENSMMUG0000000912) para diseñar cebadores capaces de amplificar la secuencia codificante del gen en el mono cinomolgo.

A continuación se transfirieron los fragmentos de ADNc que codifican los dominios extracelulares al vector de expresión de mamíferos pDEST12.2 (Invitrogen) utilizando la enzima LR Gateway Clonase II de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, N.º de cat. 12538-120). El vector pDEST12.2 se había modificado para contener una marca FLAG 10xhis (DYKDDDDKAAHHHHHHHHHH) en fase con el gen insertado de interés y también por inserción del origen de replicación oriP procedente del vector pCEP4 (Invitrogen, n.º de cat. V044-50) que permite la replicación plasmídica episómica tras la transfección en líneas celulares que expresan el producto génico EBNA-1 (tales como células HEK293-EBNA). La proteína expresada en el sobrenadante de HEK293-EBNA se purificó utilizando cromatografía de afinidad a Ni-NTA (columna Hisrap HP (GE Healthcare, n.º de cat. 17-5248-02)) y a continuación por cromatografía de exclusión por tamaño (columna Superdex 200 (GE Healthcare, n.º de cat. 17-1069-01)).

Dominios extracelulares de CD80

Especies	Aminoácidos en ECD	Número de acceso (Swiss-Prot)	SEQ ID NO
Ser humano	1-242	P33681	1
Ratón	1-245	Q00609	2
Cinomolgo	1-242	NA	3

Dominios extracelulares de CD86

Especies	Aminoácidos en ECD	Número de acceso (Swiss-Prot)	SEQ ID
Ser humano	7-246	P42081	4
Ratón	1-245	P42082	5
Cinomolgo	1-242	NA	6

25

*Análisis de la afinidad de unión por resonancia de plasmones superficiales (SPR, por sus siglas en inglés)*

Se realizaron análisis por SPR de las interacciones de CTLA-4:CD80 y CD86 en una máquina de SPR Biacore 2000. Se acoplaron de manera covalente aproximadamente 200 RU de variantes de CTLA-4 mediante grupos de aminas primarias con una micromatriz CM5 de Biacore (GE healthcare, cat. n.º BR-1000-14) que utiliza un kit de acoplamiento de aminas (GE healthcare, n.º de cat. BR-1000-50). Las titulaciones de CD80 y CD86 en tampón HBS-EP (GE healthcare, n.º de cat. BR-1001-88) se hicieron fluir sobre variantes de CTLA-4 inmovilizadas. Se sustrajeron todos los componentes traza mediante el método de la doble referencia. Los análisis se realizaron utilizando un software de evaluación de Biacore que utilizaba un modelo de Langmuir 1:1 para ajustar las constantes de asociación y disociación. Cuando las variantes tuvieron cinéticas muy rápidas se realizaron análisis de equilibrio.

35 La afinidad monovalente ( $K_d$  en nM) de variantes de CTLA-4 seleccionadas y CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35) en el formato de fusión con la región Fc para ligandos humanos, murinos y de mono cinomolgo se muestra a continuación.



	CD80 humano	CD86 humano	CD80 de cino.	CD86 de cino	CD80 murino	CD86 murino
CTLA-4 de tipo natural	1540	6420	1550	6530	2950	5550
Variante 1322	8	526	6	330	ND	ND
Variante 1321	23	1085	19	960	ND	ND
Variante 1299	12	1388	10	1020	ND	ND
Variante 1315	20	1129	17	750	ND	ND
Variante 1227	11	1154	9	1020	ND	ND
Variante 1115	20	1542	18	1070	ND	ND
Variante 1114	42	1340	39	1280	2170	4860

A continuación se muestran mejoras en la afinidad (factor de mejora respecto al CTLA-4 de tipo natural en un formato de fusión con la región Fc) de variantes de CTLA-4 seleccionadas para ligandos humanos, murinos y de mono cinomolgo.

	CD80 humano	CD86 humano	CD80 de cino.	CD86 de cino.	CD80 murino	CD86 murino
CTLA-4 de tipo natural	1	1	1	1	1	1
Variante 1322	193	12	258	20	ND	ND
Variante 1321	67	6	82	7	ND	ND
Variante 1299	128	5	155	6	ND	ND
Variante 1315	77	6	91	9	ND	ND
Variante 1227	140	6	172	6	ND	ND
Variante 1115	77	4	86	6	ND	ND
Variante 1114	37	5	40	5	1	1

5

Cabe señalar que estas variantes, que fueron las variantes más potentes estudiadas en los ensayos de actividad biológica, demostraron ganancias de afinidad superiores respecto al ligando CD80 humano que al ligando CD86 humano (tal y como se resume en la Figura 6). Se observó un patrón similar de una ganancia de afinidad superior frente a CD80 que a CD86 utilizando los ligandos de cinomolgo.

10 Ejemplo 9. Estudios acelerados de estabilidad de CTLA-4 de tipo natural con mutaciones en Fc

*Expresión, purificación y cuantificación de las proteínas de CTLA-4*

15 Los ADNc que codifican el dominio extracelular de CTLA4 natural fusionado con variantes de Fc 1-4 se clonaron en pEE 12.4 (Lonza) y se expresaron en células CHO. Resumiendo, se transfectaron  $1 \times 10^6$  células CHOK1SV (Lonza) por nucleofección (Lonza) utilizando el programa U-024 y la solución V con 5 mcg de ADN plasmídico linealizado. Tras la transfección, se cultivaron las células en CD-CHO (Invitrogen), suplementado con  $1 \times$  GS y MSX  $50 \mu\text{M}$ . Las células comenzaron a crecer aproximadamente 2 semanas después de la transfección, momento en el cual se expandieron en frascos de agitación para la producción de las proteínas. Para la purificación, se utilizaron una serie de pasos comenzando con un paso de captura Mabselect, seguido por un paso de depuración por intercambio aniónico SuperQ, seguido por SEC para eliminar los agregados. Las proteínas se almacenaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.2.

20 *Estudios de estabilidad*

Se realizaron estudios de estabilidad en moléculas de CTLA-4 fusionadas con diferentes variantes de Fc para comparar su estabilidad y determinar la configuración de Fc más estable. Las moléculas que se estudiaron incluyeron: CTLA-4 variante 1 de la región Fc (SEQ ID NO: 7); CTLA-4 variante 2 de la región Fc (SEQ ID NO: 8); CTLA-4 variante 3 de la región Fc (SEQ ID NO: 9); CTLA-4 variante 4 de la región Fc (SEQ ID NO: 10). Las diferencias de aminoácidos en la región Fc están resaltadas en la Figura 1B para la variante 1 de la región Fc (SEQ ID NO: 57); variante 2 de la región Fc (SEQ ID NO: 58); variante 3 de la región Fc (SEQ ID NO: 59) y variante 4 de la región Fc (SEQ ID NO: 60).

CTLA-4 variante 1 de la región Fc (SEQ ID NO: 7) es la molécula de Abatacept, que comprende el CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35) fusionado con una región Fc de IgG1 con una bisagra modificada (SEQ ID NO: 57).

CTLA-4 variante 2 de la región Fc (SEQ ID NO: 8) es Abatacept modificado para incorporar una mutación YTE en la región Fc y comprende CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35) fusionado con la región Fc de IgG1 con una bisagra modificada y una mutación YTE (SEQ ID NO: 58).

CTLA-4 variante 3 de la región Fc (SEQ ID NO: 9) comprende CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35) fusionado con una región Fc de IgG1 en la cual las mutaciones C>S observadas en Abatacept revierten, que comprende una bisagra de tipo natural, y que además incluye una mutación triple (TM) y una mutación YTE (SEQ ID NO: 59).

CTLA-4 variante 4 de la región Fc (SEQ ID NO: 10) comprende un CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35) fusionado con una región Fc de IgG4 que comprende una mutación YTE y una mutación en la región bisagra que comprende prolina en la posición 111 (SEQ ID NO: 60).

La posición 111 en la numeración Swiss-Prot corresponde al residuo 14 de la secuencia de IgG1 correspondiente SEQ ID NO: 56 tal como se muestra en la Figura 1, o al residuo 228 en la región constante completa de IgG4. Se sabe que la introducción de una mutación de serina a prolina en esta posición estabiliza la interacción disulfuro intercatenaria y por lo tanto minimiza la formación de medias moléculas de IgG<sub>4</sub> (Aalberse y Schuurman, *Immunology* 105(1):9-19 2002; Van der Neut Kofschoten *et al.*, *Science* 307(5844):1554-7 2007; Angal *et al.*, *Mol Immunol* 30(1):105-8 1993; Schuurman *et al.* *Mol Immunol* 38(1):1-8 2001) y de esta manera minimiza los retos asociados con el desarrollo del fármaco candidato. Además, ya que este residuo de prolina se encuentra en la posición correspondiente de la IgG<sub>1</sub>, no se anticipa que suscite ninguna preocupación en lo que se refiere a la inmunogenicidad.

Las moléculas se recibieron en forma líquida con ~10 mg/mL en tampón PBS. Se concentraron las 4 moléculas utilizando filtros de ultra centrifuga Amicon, PM del punto de corte de 30 000. Las moléculas se centrifugaron a 4200g hasta que se logró el volumen objetivo (30-60 minutos). Se midieron las concentraciones espectrofotométricamente utilizando un coeficiente de extinción de anticuerpos estándar de 1.4. Se calculó que las concentraciones finales estaban comprendidas entre 71-85 mg/mL. Aunque en este ejemplo se utilizó un coeficiente de extinción de un anticuerpo de 1.4, posteriormente se determinó que el coeficiente de extinción real del polipéptido estaba más próximo a 1.1. Por lo tanto, estas concentraciones calculadas representan de hecho un intervalo de concentración de 91-108 mg/mL. Se pueden lograr concentraciones más elevadas si se desea prolongando la ultrafiltración, sometida a restricciones volumétricas.

Se incubaron muestras de cada variante de la región Fc a 5 °C y 25 °C durante 1 mes. La cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SE-HPLC) fue el ensayo indicador de la estabilidad utilizado para determinar y comparar las tasas de degradación de las 4 moléculas. Se llevó a cabo SE-HPLC de acuerdo con SOP DV-9525 con un caudal de 1 mL/min. Cualquier pico que eluya antes del pico del monómero (con un tiempo de elución inferior al del monómero) en el cromatograma de HPLC se designa como un pico de agregados. Cualquier pico que eluya después del pico del monómero (con un tiempo de elución superior al del monómero) se designa como un pico de fragmentos. El porcentaje total de agregados y fragmentos se determina mediante el área del pico o de los picos de agregados y el pico o los picos de fragmentos como una fracción del área total de todos los picos proteicos en el cromatograma. Antes de la incubación, se llevó a cabo SE-HPLC en todas las muestras para el punto de datos de tiempo 0. A partir de ahí, se recogieron los datos de SE-HPLC cada semana para el estudio de estabilidad a 25 °C y cada 2 semanas para el estudio de estabilidad a 5 °C. La duración total de ambos estudios fue de 1 mes. A continuación se muestran las tasas de agregación, fragmentación y degradación calculadas utilizando un ajuste lineal respecto a los datos de 1 mes.

Tasas después de 1 mes a 5 °C

Molécula	% de agregados/mes	% de fragmentos/mes	% de pérdida de pureza/mes
Variante 1 de la región Fc (SEQ ID NO 57)	2.6	0.4	3.0
Variante 2 de la región Fc (SEQ ID NO 58)	3.2	0	3.2
Variante 3 de la región Fc (SEQ ID NO 59)	1.0	0	1.0

## ES 2 777 778 T3

Variante 4 de la región Fc (SEQ ID NO 60)	0.8	0.9	1.7
---	-----	-----	-----

Tasas después de 1 mes a 25 °C

Molécula	% de agregados/mes	% de fragmentos/mes	% de pérdida de pureza/mes
Variante 1 de la región Fc (SEQ ID NO 57)	12.8	0.7	13.4
Variante 2 de la región Fc (SEQ ID NO 58)	14.3	0.9	15.2
Variante 3 de la región Fc (SEQ ID NO 59)	7.8	0	7.8
Variante 4 de la región Fc (SEQ ID NO 60)	9.2	3.6	12.8

5 Basándose en estos datos, la variante 3 de la región Fc (SEQ ID NO: 59) se seleccionó como la pareja para la fusión óptima basándose en las tasas más bajas de pérdida de pureza tanto a 5 °C como a 25 °C.

### Ejemplo 10 Estudios acelerados de estabilidad de variantes de CTLA-4 fusionadas con la variante 3 de la región Fc

10 Se realizaron estudios de estabilidad en 6 de las moléculas variantes de CTLA-4 más potentes fusionadas con la variante 3 de la región Fc (SEQ ID NO: 59) para determinar la variante de CTLA-4 más estable. Las moléculas que se estudiaron en este formato fueron: la variante 1115 (SEQ ID NO: 15), la variante 1227 (SEQ ID NO: 16), la variante 1299 (SEQ ID NO: 13), la variante 1315 (SEQ ID NO: 14), la variante 1321 (SEQ ID NO: 12), la variante 1322 (SEQ ID NO: 11).

15 Las moléculas se recibieron en forma líquida con ~10 mg/mL en tampón PBS. Se concentraron las 6 moléculas utilizando filtros de ultra centrifuga Amicon, PM del punto de corte de 30 000. Las moléculas se centrifugaron a 4200g hasta que se logró el volumen objetivo (30-60 minutos). Se calcularon los coeficientes de extinción utilizando las secuencias de aminoácidos. Los coeficientes de extinción calculados fueron 1.10 para 1315 y 1321; y 1.09 para 1115, 1227, 1299 y 1322. Se midieron las concentraciones utilizando el coeficiente de extinción apropiado. Las concentraciones finales estuvieron comprendidas entre 94.6-101.6 mg/mL.

20 Se realizaron estudios de estabilidad a 5 °C y 25 °C siguiendo las mismas directrices descritas en la sección anterior, salvo que únicamente hubo recogida en los puntos temporales correspondientes a 0 y 1 meses para el estudio de estabilidad a 5 °C. La duración total de ambos estudios fue de 1 mes. A continuación se muestran las tasas de agregación, fragmentación y degradación calculadas utilizando un ajuste lineal respecto a los datos de 1 mes.

Tasas después de 1 mes a 25 °C

Molécula	% de agregados/mes	% de fragmentos/mes	% de pérdida de pureza/mes
1115	6.0	0	6.0
1227	4.0	0	4.0
1315	24.0	0	24.0
1299	1.5	0	1.5
1321	8.8	0	8.8
1322	1.4	0	1.4

Tasas después de 1 mes a 5 °C

Molécula	% de agregados/mes	% de fragmentos/mes	% de pérdida de pureza/mes
----------	--------------------	---------------------	----------------------------

## ES 2 777 778 T3

1115	0.4	0	0.4
1227	0.8	0	0.8
1315	2.6	0	2.6
1299	0.2	0	0.2
1321	0.6	0	0.6
1322	0.1	0	0.1

Se observó que las variantes 1299 y 1322 tenían los niveles más bajos de pérdida de pureza tanto en los estudios a 5 °C como a 25 °C a lo largo de 1 mes. Por lo tanto, los estudios de estabilidad se prolongaron hasta 6 meses a 5 °C para las variantes 1299 y 1322. A continuación se muestran los resultados obtenidos a partir de los puntos temporales mensuales.

### 5 Datos de estabilidad para 1299 a 5 °C

Punto temporal (meses)	% de agregados	% de fragmentos	% de pureza
0	1.1	0.0	98.9
1	1.4	0.0	98.6
2	2.0	0.0	98.0
3	1.9	0.0	98.1
4	2.4	0.0	97.6
5			
6			

% de pérdida de pureza / año calculado a partir de un ajuste lineal de los datos = 3.6%

### Datos de estabilidad para 1322 a 5 °C

Punto temporal (meses)	% de agregados	% de fragmentos	% de pureza
0	1.2	0.0	98.8
1	1.4	0.0	79.5
2	1.8	0.0	98.2
3	1.7	0.0	98.3
4	2.1	0.0	97.9
5			
6			

% de pérdida de pureza / año calculado a partir de un ajuste lineal de los datos = 2.6%

### Ejemplo 11 Construcción de una molécula de CTLA-4 tetravalente

#### 10 *Diseño y construcción de vectores de expresión de CTLA-4 tetravalente*

Utilizando IgG NIP 74 que se une a nitrofenol (cadena pesada SEQ ID NO: 17; (cadena ligera SEQ ID NO: 18) como estructura base, se produjo una CTLA-4 tetravalente fusionando CTLA-4 con el extremo amino de las cadenas V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo (Figura 7A). Se produjeron los constructos de expresión fusionando CTLA-4 con V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> utilizando la estrategia de PCR en 2 pasos y a continuación subclonando los productos de PCR en los vectores de expresión de IgG que contenían los dominios constantes del anticuerpo. La PCR primaria amplificó la CTLA-4 y la V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de IgG con cebadores específicos de los genes (SEQ ID NOS 21-28) que añadieron un conector flexible al extremo 3' de CTLA-4 y

15

al extremo 5' de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>. La PCR "pull-through" secundaria unió la CTLA-4 al extremo 5' de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> hibridando las secuencias del conector complementarias. El constructo final CTLA-4-V<sub>H</sub> se amplificó utilizando cebadores que introdujeron un BssHII en el extremo 5' y un sitio BstEII en el extremo 3' (SEQ ID NOS 29-30). El constructo final CTLA-4-V<sub>L</sub> se amplificó utilizando cebadores que introdujeron un ApaLI en el extremo 5' y un sitio PaeI en el extremo 3' (SEQ ID NOS 31-32). A continuación los productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción específicas antes de ligarlos directamente en los vectores de expresión de IgG predigeridos, pEU1.4 para el casete de CTLA-4-V<sub>H</sub> y pEU3.4 para el casete CTLA-4-V<sub>L</sub>, y se utilizaron para transformar químicamente células DH5-alfa de *E.coli* competentes. Los clones correctos, que correspondían a las SEQ ID NOS 19 y 20, se identificaron por análisis secuencial para los estudios de expresión.

#### 10 *Expresión y purificación del CTLA-4 tetramérico*

Para ambos plásmidos requeridos para la transfección, uno que codificaba para la fusión de la cadena pesada de CTLA-4 y uno que codificaba para la fusión de la cadena ligera de CTLA-4, se utilizó una única colonia para inocular 100 mL de caldo 2xTY que contenía 100 µg/mL de ampicilina. Los cultivos se incubaron durante toda la noche (16 horas) a 37 °C y 300 rpm. Se aisló el ADN plasmídico del sedimento bacteriano utilizando el kit EndoFree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN; 12362) siguiendo las instrucciones del fabricante. En la mañana de la transfección, se sembraron las células CHO con una concentración de un millón de células por mL en medio CD-CHO (Invitrogen; 10743-029) que contenía sulfoximina de L-metionina 25 µM (Sigma; M5379). Las células se cultivaron en un volumen de 500 mL y se incubaron a 37 °C, 140 rpm, 80% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Con el fin de formar complejos de ADN-PEI para la transfección, se mezclaron 250 µg de cada vector y se diluyeron en NaCl 150 mM para proporcionar 500 µg de ADN en un volumen final de 1 mL. A continuación se mezcló el ADN con 1 mL de PEI con una concentración de 5 mg/mL (Polysciences; 23966), se diluyó en NaCl 150 mM y se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto. A continuación se añadió cuidadosamente la mezcla ADN-PEI al cultivo de CEP6 que se había incubado durante 24 horas antes de la adición de 150 mL de CD-CHO Efficient Feed B (Invitrogen; A10240). A continuación se incubó el cultivo durante seis días más.

El cultivo se centrifugó a 2000g durante 30 minutos; el sobrenadante del cultivo aclarado se filtró a continuación a través de una Stericup de 500 mL (Millipore; SCGVU05RE). Se realizó la purificación del CTLA-4 tetravalente, a partir del sobrenadante del cultivo aclarado utilizando un sistema ÄKTApurifier 10 (GE Healthcare; 28-4062-64) y cromatografía de afinidad seguida por cromatografía de filtración en gel. Se equilibró una columna de 5 mL MabSelect Sure (GE Healthcare; 11-0034-94) con diez volúmenes de columna de D-PBS (Invitrogen; 14040-174). El sobrenadante del cultivo aclarado se pasó sobre la columna antes de lavar la columna con diez volúmenes de columna más de D-PBS. Se eluyó la proteína unida con glicina 0.1 M, pH 2.7 y se recogieron fracciones de 1 mL. Se neutralizó cada fracción con 100 µL de Tris 1M, pH 10 y las fracciones que contenían la proteína eluida se combinaron y concentraron hasta un volumen de 2 mL utilizando una unidad de filtración Vivaspin, MWCO (siglas en inglés de PM del punto de corte) de 10 000 (Sartorius Stedim; VS2002) siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra concentrada de 2 mL se cargó sobre una columna de filtración en gel HiLoad Superdex 200, 16/60 (GE Healthcare; 17-1069-01), que se había equilibrado en D-PBS. A lo largo del proceso se recogieron fracciones de 1.2 mL. Aquellas fracciones que contenían la proteína objetivo con el peso molecular correcto (volumen de retención de 56 mL) se combinaron, se concentraron hasta un volumen de 1 mL utilizando una unidad de filtración Vivaspin, MWCO de 10 000 y se almacenó a -80 °C.

El perfil obtenido del CTLA-4 tetramérico purificado junto con el CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35) en el formato de fusión con la región Fc en el ensayo celular dual Raji-Jurkat y sus datos se muestran en la Figura 8A. Los valores de CI<sub>50</sub> en este ensayo para la CTLA-4 tetramérica y CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35) en el formato de fusión con la región Fc fueron 1.93 nM y 11.39 nM, respectivamente. Esto indica una ganancia en la potencia de 5-9 veces respecto a la conversión de un formato de fusión con la región Fc dimérico en un formato similar a IgG tetramérico.

#### Aspectos

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MedImmune Limited

5 <120> Variantes de CTLA-4

<130> CTLA4-101

<160> 72

10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 274

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: marca his 10 del CD80 humano

20

<400> 1

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr

1            5                    10                    15

25

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys

20                    25                    30

30 Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu

35                    40                    45

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile

50                    55                    60

35

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp

65                    70                    75                    80

ES 2 777 778 T3

Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr

85 90 95

5 Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly

100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg

115 120 125

10

Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr

130 135 140

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile

15 145 150 155 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu

165 170 175

20 Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp

180 185 190

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met

195 200 205

25

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg

210 215 220

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro

30 225 230 235 240

Asp Asn Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Gly Ala Ala Asp Tyr

245 250 255

35 Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ala His His His His His His His His

260 265 270

His His

<210> 2

5 <211> 277

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: marca his 10 del CD80 murino

<400> 2

Met Ala Cys Asn Cys Gln Leu Met Gln Asp Thr Pro Leu Leu Lys Phe

15 1 5 10 15

Pro Cys Pro Arg Leu Ile Leu Leu Phe Val Leu Leu Ile Arg Leu Ser

20 25 30

20 Gln Val Ser Ser Asp Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp

35 40 45

Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser

50 55 60

25

Glu Asp Arg Ile Tyr Trp Gln Lys His Asp Lys Val Val Leu Ser Val

65 70 75 80

Ile Ala Gly Lys Leu Lys Val Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu

30 85 90 95

Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser

100 105 110

35 Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr

115 120 125



ES 2 777 778 T3

Tyr Glu Val Lys His Leu Ala Leu Val Lys Leu Ser Ile Lys Ala Asp

130 135 140

Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr

5 145 150 155 160

Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe

165 170 175

10 Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile

180 185 190

Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp

195 200 205

15

Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly

210 215 220

Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp

20 225 230 235 240

Pro Pro Asp Ser Lys Tyr Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Gly Ala

245 250 255

25 Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ala His His His His His

260 265 270

His His His His His

275

30

<210> 3

<211> 274

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia sintética: marca his 10 del CD80 cinomolgo

ES 2 777 778 T3

<400> 3

Met Gly His Thr Trp Arg Gln Gly Ile Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr

5 1 5 10 15

Leu Lys Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Cys Leu Ser His Phe Cys

20 25 30

10 Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu

35 40 45

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile

50 55 60

15

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp

65 70 75 80

Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr

20 85 90 95

Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly

100 105 110

25 Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg

115 120 125

Glu His Leu Ala Glu Val Met Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr

130 135 140

30

Pro Ser Ile Thr Asp Phe Glu Ile Pro Pro Ser Asn Ile Arg Arg Ile

145 150 155 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu

35 165 170 175

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Ser Thr Thr Val Ser Gln Asp

ES 2 777 778 T3

180 185 190

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Thr Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met

195 200 205

5

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg

210 215 220

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Pro Lys Gln Glu His Phe Pro

10 225 230 235 240

Asp Asn Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Gly Ala Ala Asp Tyr

245 250 255

15 Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ala His His His His His His His His

260 265 270

His His

20

<210> 4

<211> 271

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia sintética: marca his 10 del CD86 humano

<400> 4

30

Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met Ala Phe Leu Leu Ser Gly

1 5 10 15

Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu

35 20 25 30

Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val

ES 2 777 778 T3

35 40 45

Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu

50 55 60

5

Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr

65 70 75 80

Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile

10 85 90 95

Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr

100 105 110

15 Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

115 120 125

Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn

130 135 140

20

Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro

145 150 155 160

Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr

25 165 170 175

Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp

180 185 190

30 Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met

195 200 205

Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser

210 215 220

35

Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Asp

225 230 235 240

ES 2 777 778 T3

Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Gly Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp  
245 250 255

5 Asp Asp Lys Ala Ala His His His His His His His His His His  
260 265 270

<210> 5

<211> 277

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: marca his 10 del CD86 murino

15

<400> 5

Met Asp Pro Arg Cys Thr Met Gly Leu Ala Ile Leu Ile Phe Val Thr  
1 5 10 15

20

Val Leu Leu Ile Ser Asp Ala Val Ser Val Glu Thr Gln Ala Tyr Phe  
20 25 30

Asn Gly Thr Ala Tyr Leu Pro Cys Pro Phe Thr Lys Ala Gln Asn Ile

25

35 40 45

Ser Leu Ser Glu Leu Val Val Phe Trp Gln Asp Gln Gln Lys Leu Val  
50 55 60

30 Leu Tyr Glu His Tyr Leu Gly Thr Glu Lys Leu Asp Ser Val Asn Ala

65 70 75 80

Lys Tyr Leu Gly Arg Thr Ser Phe Asp Arg Asn Asn Trp Thr Leu Arg

85 90 95

35

Leu His Asn Val Gln Ile Lys Asp Met Gly Ser Tyr Asp Cys Phe Ile

100 105 110

ES 2 777 778 T3

Gln Lys Lys Pro Pro Thr Gly Ser Ile Ile Leu Gln Gln Thr Leu Thr

115 120 125

5 Glu Leu Ser Val Ile Ala Asn Phe Ser Glu Pro Glu Ile Lys Leu Ala

130 135 140

Gln Asn Val Thr Gly Asn Ser Gly Ile Asn Leu Thr Cys Thr Ser Lys

145 150 155 160

10

Gln Gly His Pro Lys Pro Lys Lys Met Tyr Phe Leu Ile Thr Asn Ser

165 170 175

Thr Asn Glu Tyr Gly Asp Asn Met Gln Ile Ser Gln Asp Asn Val Thr

15

180 185 190

Glu Leu Phe Ser Ile Ser Asn Ser Leu Ser Leu Ser Phe Pro Asp Gly

195 200 205

20 Val Trp His Met Thr Val Val Cys Val Leu Glu Thr Glu Ser Met Lys

210 215 220

Ile Ser Ser Lys Pro Leu Asn Phe Thr Gln Glu Phe Pro Ser Pro Gln

225 230 235 240

25

Thr Tyr Trp Lys Glu Tyr Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Gly Ala

245 250 255

Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ala His His His His His

30

260 265 270

His His His His His

275

35 <210> 6

<211> 271

<212> PRT

ES 2 777 778 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: marca his 10 del CD86 cinomolgo

5

<400> 6

Met Gly Leu Ser Asn Thr Leu Phe Val Met Ala Phe Leu Leu Ser Gly

1 5 10 15

10

Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu

20 25 30

Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Arg Ser Leu Ser Glu Leu Val

15

35 40 45

Val Phe Trp Gln Asn Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu

50 55 60

20

Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr

65 70 75 80

Ser Phe Asp Pro Glu Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile

85 90 95

25

Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Arg Pro Thr

100 105 110

Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala

30

115 120 125

Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn

130 135 140

35

Met Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro

145 150 155 160

ES 2 777 778 T3

Glu Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr  
165 170 175

5 Asp Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp  
180 185 190

Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met  
195 200 205

10 Thr Ile Phe Cys Val Leu Glu Thr Asp Lys Thr Gln Leu Leu Ser Ser  
210 215 220

15 Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Asp  
225 230 235 240

Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Gly Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp  
245 250 255

20 Asp Asp Lys Ala Ala His His His His His His His His His  
260 265 270

<210> 7

<211> 357

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: CTLA4 variante 1 de la región Fc

[CTLA-4 de tipo natural región Fc de IgG1 (bisagra modificada)]

30

<400> 7

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

35

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30



ES 2 777 778 T3

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

5 Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

10

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

15 100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys

115 120 125

20 Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu

130 135 140

Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

145 150 155 160

25

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

165 170 175

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

30 180 185 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

195 200 205

35 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

210 215 220

ES 2 777 778 T3

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

225            230            235            240

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

5            245            250            255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln

260            265            270

10 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

275            280            285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

290            295            300

15

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

305            310            315            320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

20            325            330            335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

340            345            350

25 Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 8

<211> 357

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: CTLA4 variante 2 de la región Fc

35 [CTLA-4 de tipo natural región Fc de IgG1 (bisagra  
modificada) con YTE]

ES 2 777 778 T3

<400> 8

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

5

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

10 35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

15 Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85 90 95

20

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys

25 115 120 125

Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu

130 135 140

30 Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

145 150 155 160

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

165 170 175

35

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

180 185 190

ES 2 777 778 T3

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
195 200 205

5 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
210 215 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
225 230 235 240

10

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
245 250 255

15

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln  
260 265 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
275 280 285

20

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
290 295 300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
305 310 315 320

25

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
340 345 350

30

Leu Ser Pro Gly Lys  
355

35

<210> 9

<211> 357

<212> PRT

ES 2 777 778 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: CTLA4 variante 3 de la región Fc

5 [CTLA-4 de tipo natural región Fc de IgG1 con TM e YTE]

<400> 9

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

10 1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

15 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

20

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

25 85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

30 Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Pro Lys

115 120 125

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

130 135 140

35

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

145 150 155 160

ES 2 777 778 T3

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

165 170 175

5 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

180 185 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

195 200 205

10

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

210 215 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

15 225 230 235 240

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

245 250 255

20 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

260 265 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

275 280 285

25

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

290 295 300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

30 305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

325 330 335

35 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 10

5 <211> 354

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: CTLA4 variante 4 de la región Fc

[CTLA-4 de tipo natural región Fc de IgG4 con YTE y una  
Prolina bisagra]

<400> 10

15

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1            5            10            15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20            20            25            30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35            40            45

25 Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50            55            60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65            70            75            80

30

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85            90            95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

35            100            105            110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Ser Lys

ES 2 777 778 T3

115 120 125

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly

130 135 140

5

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile

145 150 155 160

Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu

10 165 170 175

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

180 185 190

15 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg

195 200 205

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

210 215 220

20

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu

225 230 235 240

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr

25 245 250 255

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

260 265 270

30 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

275 280 285

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

290 295 300

35

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp

305 310 315 320



ES 2 777 778 T3

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
325 330 335

5 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu  
340 345 350

Gly Lys

10

<210> 11

<211> 357

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 1322 de CTLA-4 región Fc  
de IgG1 con TM e YTE (357aa)]

20

<400> 11

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile  
1 5 10 15

25 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Ser Lys Ala Thr Glu Val  
20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys  
35 40 45

30

Ala Ala Thr Tyr Met Lys Gly Ser Glu Leu Ser Thr Gln Asp Tyr Pro  
50 55 60

35 Asn Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln  
65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

ES 2 777 778 T3

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

5

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Pro Lys

115 120 125

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

10 130 135 140

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

145 150 155 160

15 Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

165 170 175

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

180 185 190

20

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

195 200 205

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

25 210 215 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

225 230 235 240

30 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

245 250 255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

260 265 270

35

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

275 280 285

ES 2 777 778 T3

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
290 295 300

5 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
325 330 335

10

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys

15

355

<210> 12

<211> 357

<212> PRT

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 1321 de CTLA-4 región Fc  
de IgG1 con TM e YTE (357aa)]

25

<400> 12

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ser

1 5 10 15

30

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser

ES 2 777 778 T3

50            55            60

Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Arg

65            70            75            80

5

Gly Leu Arg Ala Ser Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

              85            90            95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

10            100            105            110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Pro Lys

              115            120            125

15

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

              130            135            140

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

145            150            155            160

20

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

              165            170            175

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

25            180            185            190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

              195            200            205

30

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

              210            215            220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

225            230            235            240

35

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

              245            250            255

ES 2 777 778 T3

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
260 265 270

5 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
275 280 285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
290 295 300

10

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
305 310 315 320

15

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
340 345 350

20

Leu Ser Pro Gly Lys  
355

<210> 13

<211> 357

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 1299 de CTLA-4 región Fc  
de IgG1 con TM e YTE (357aa)]

30

<400> 13

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Arg

35

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Thr Asn Pro Ser Lys Ala Thr Glu Val

ES 2 777 778 T3

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

5

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ala Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

10 65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Gln Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95

15 Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Pro Lys

115 120 125

20

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

130 135 140

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

25 145 150 155 160

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

165 170 175

30 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

180 185 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

195 200 205

35

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

210 215 220

ES 2 777 778 T3

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
225            230            235            240

5 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
          245            250            255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
          260            265            270

10

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
          275            280            285

15

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
          290            295            300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
305            310            315            320

20

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
          325            330            335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
          340            345            350

25

Leu Ser Pro Gly Lys  
          355

<210> 14

30

<211> 357

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35

<223> Secuencia sintética: Variante 1315 de CTLA-4 región Fc  
de IgG1 con TM e YTE (357aa)]

ES 2 777 778 T3

<400> 14

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ser

1 5 10 15

5

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

10 35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

15 Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Arg

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Ser Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95

20

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Pro Lys

25 115 120 125

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

130 135 140

30 Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

145 150 155 160

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

165 170 175

35

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

180 185 190



ES 2 777 778 T3

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
195 200 205

5 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
210 215 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
225 230 235 240

10

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
245 250 255

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
15 260 265 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
275 280 285

20 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
290 295 300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
305 310 315 320

25

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
30 340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys  
355

35 <210> 15  
<211> 357  
<212> PRT

ES 2 777 778 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 1115 de CTLA-4 región Fc  
de IgG1 con TM e YTE (357aa)]

5

<400> 15

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Val

10

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

15

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

20

Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Gln Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

25

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

30

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Pro Lys

115 120 125

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

130 135 140

35

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

145 150 155 160

ES 2 777 778 T3

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

165 170 175

5 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

180 185 190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

195 200 205

10

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

210 215 220

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala

15 225 230 235 240

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

245 250 255

20 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

260 265 270

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

275 280 285

25

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

290 295 300

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

30 305 310 315 320

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

325 330 335

35 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

340 345 350

# ES 2 777 778 T3

Leu Ser Pro Gly Lys

355

<210> 16

5 <211> 357

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Secuencia sintética: Variante 1227 de CTLA-4 región Fc  
de IgG1 con TM e YTE (357aa)]

<400> 16

15 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ser

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Ser Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

20

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ala Thr Phe Leu Asp Asp Ser

25 50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

30 Gly Leu Arg Ala Gln Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys His Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

35

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Pro Lys

115 120 125

ES 2 777 778 T3

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
130 135 140

5 Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
145 150 155 160

Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
165 170 175

10

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
180 185 190

15

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
195 200 205

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
210 215 220

20

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
225 230 235 240

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
245 250 255

25

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
260 265 270

30

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
275 280 285

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
290 295 300

35

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
305 310 315 320

ES 2 777 778 T3

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
325 330 335

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
5 340 345 350

Leu Ser Pro Gly Lys  
355

10 <210> 17  
<211> 456  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia sintética: cadena pesada de NIP 74  
(para el tetrámero)

<400> 17

20 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
25 20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45

30 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe  
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

35 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

ES 2 777 778 T3

Ala Arg Arg Gly Tyr Asp Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr

100 105 110

5 Gly Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Met Val Thr Val Thr Ala Ser

115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr

130 135 140

10

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro

145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

15

165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

180 185 190

20 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile

195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val

210 215 220

25

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

30

245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

260 265 270

35 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val

275 280 285

ES 2 777 778 T3

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
290 295 300

5 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
325 330 335

10 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
340 345 350

15 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
370 375 380

20 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
405 410 415

25 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
420 425 430

30 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
450 455

<210> 18

35 <211> 217

<212> PRT

<213> Secuencia artificial



ES 2 777 778 T3

<220>

<223> Secuencia sintética: cadena ligera de NIP 74

(para el tetrámero)

5

<400> 18

Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

10

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly

20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu

15

35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe

50 55 60

20

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser

85 90 95

25

Leu Ser Asp Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

100 105 110

Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

30

115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

130 135 140

35

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val

145 150 155 160

ES 2 777 778 T3

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys  
165 170 175

5 Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser  
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu  
195 200 205

10 Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
210 215

<210> 19

<211> 608

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: cadena pesada del tetrámero de CTLA-4

20

<400> 19

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile  
1 5 10 15

25

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val  
20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys  
30 35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser  
50 55 60

35 Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln  
65 70 75 80

ES 2 777 778 T3

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85 90 95

5 Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gly Gly Ser Gly

115 120 125

10

Ser Ala Thr Gly Gly Ser Gly Ser Thr Ala Ser Ser Gly Ser Gly Ser

130 135 140

Ala Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly

15 145 150 155 160

Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala

165 170 175

20 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala

180 185 190

Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly

195 200 205

25

Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg

210 215 220

Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser

30 225 230 235 240

Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Gly Tyr Asp Tyr Gly

245 250 255

35 Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Lys Gly

260 265 270

ES 2 777 778 T3

Thr Met Val Thr Val Thr Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
275 280 285

5 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
290 295 300

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
305 310 315 320

10 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
325 330 335

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
340 345 350

15 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
355 360 365

20 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
370 375 380

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
385 390 395 400

25 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
405 410 415

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
420 425 430

30 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
435 440 445

35 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
450 455 460

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

ES 2 777 778 T3

465            470            475            480

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr

485            490            495

5

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

500            505            510

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

10

515            520            525

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

530            535            540

15 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

545            550            555            560

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser

565            570            575

20

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

580            585            590

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

25

595            600            605

<210> 20

<211> 369

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: cadena ligera del tetrámero de CTLA-4

35 <400> 20

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

ES 2 777 778 T3

1            5            10            15  
  
Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val  
          20            25            30  
5  
Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys  
          35            40            45  
  
Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser  
10        50            55            60  
  
Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln  
65            70            75            80  
  
15        Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu  
          85            90            95  
  
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile  
          100            105            110  
20  
Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gly Gly Ser Gly  
          115            120            125  
  
Ser Thr Ala Gly Gly Ser Gly Ser Ala Thr Ser Ser Gly Ser Gly Ser  
25        130            135            140  
  
Ala Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro  
145            150            155            160  
  
30        Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly  
          165            170            175  
  
Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln  
          180            185            190  
35  
Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg  
          195            200            205

ES 2 777 778 T3

Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser

210 215 220

5 Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr

225 230 235 240

Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Asp Val Val Phe Gly Gly

245 250 255

10

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val

260 265 270

Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr

15

275 280 285

Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala

290 295 300

20 Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys

305 310 315 320

Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser

325 330 335

25

Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val

340 345 350

Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys

30

355 360 365

Ser

<210> 21

35

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: oligonucleótido 5prima para la  
amplificación de CTLA4 para la fusión con VH de NIP74

5

<400> 21

gcttgcgcgc actccgcaat gc 22

<210> 22

10 <211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia sintética: oligonucleótido 3prima para la  
amplificación de CTLA4 para la fusión con VH de NIP74

<400> 22

ccagaaccag aagaagcggg ag 22

20

<210> 23

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia sintética: oligonucleótido 5prima para la  
amplificación de CTLA4 para la fusión con VL de NIP74

30 <400> 23

gcttggtcac tccgcaatgc acg 23

<210> 24

<211> 23

35 <212> ADN

<213> Secuencia artificial



<220>

<223> Secuencia sintética: oligonucleótido 3prima para la  
amplificación de CTLA4 para la fusión con VL de NIP74

5 <400> 24

gagccagaag aggtagcaga acc 23

<210> 25

<211> 70

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia sintética: oligonucleótido 5prima para la  
amplificación de VH de NIP74 para la fusión con CTLA4

<400> 25

ctaccgcttc ttctggttct ggttctgcta ccggtggtgg tgggtggtggc caggtgcagc 60

20 tggtcagtc

70

<210> 26

<211> 18

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: oligonucleótido 3prima para la  
amplificación de VH de NIP74 para la fusión con CTLA4

30

<400> 26

ccagggggaa gaccgatg 18

<210> 27

35 <211> 74

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: oligonucleótido 5prima para la  
amplificación de VL de NIP74 para la fusión con CTLA4

5

<400> 27

ggttctgcta cctctctgg ctctggttct gcgaccggtg gtggcgggtg tggccagtct 60

gtcgtgacgc agcc

74

10

<210> 28

<211> 53

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia sintética: oligonucleótido 3prima para la  
amplificación de VL de NIP74 para la fusión con CTLA4

20

<400> 28

gcacttaatt aagttagatc tattctgact cacctaggac ggtcagcttg gtc 53

<210> 29

<211> 22

25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: oligonucleótido 5prima para el  
ensamblaje de la fusión CTLA4-VH de NIP74

30

<400> 29

gcttgcgcgc actccgcaat gc

22

35

<210> 30

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia sintética: oligonucleótido 3prima para el  
ensamblaje de la fusión CTLA4-VH de NIP74

<400> 30

ccagggggaa gaccgatg 18

10 <210> 31

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia sintética: oligonucleótido 5prima para el  
ensamblaje de la fusión CTLA4-VL de NIP74

<400> 31

20 gcttgtgcac tccgcaatgc acg 23

<210> 32

<211> 53

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: oligonucleótido 3prima para el  
ensamblaje de la fusión CTLA4-VL de NIP74

30

<400> 32

gcacttaatt aagttgatc tattctgact cacctaggac ggtcagcttg gtc 53

<210> 33

35 <211> 64

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Oligonucleótido de aleatorización  
para la construcción de la colección de presentación

5 de ribosomas dirigida "bucle4"

<220>

<221> misc\_feature

<222> (22)..(23)

10 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (25)..(26)

15 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (28)..(29)

20 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (31)..(32)

25 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (34)..(35)

30 <223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc\_feature

<222> (37)..(38)

35 <223> n es a, c, g, o t

<220>

ES 2 777 778 T3

<221> misc\_feature

<222> (40)..(41)

<223> n es a, c, g, o t

5 <400> 33

ccactggagg tgcccgtgca snnsnnsnns nnsnnsnnsn ncaactcatt ccccatcatg 60

tagg 64

10 <210> 34

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia sintética: Oligonucleótido de superposición  
para la construcción de la colección de presentación  
de ribosomas dirigida "bucle4"

20 <400> 34

tgcacgggca cctccagtgg aaatc 25

<210> 35

<211> 124

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

30 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

35

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

ES 2 777 778 T3

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

5 Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

85 90 95

10

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

15 115 120

<210> 36

<211> 124

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 1315 de CTLA-4

25 <400> 36

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ser

1 5 10 15

30 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

35

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

ES 2 777 778 T3

Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Arg

65            70            75            80

5 Gly Leu Arg Ala Ser Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85            90            95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100            105            110

10

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115            120

<210> 37

15

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Secuencia sintética: Variante 1322 de CTLA-4

<400> 37

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

25

1            5            10            15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Ser Lys Ala Thr Glu Val

20            25            30

30 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35            40            45

Ala Ala Thr Tyr Met Lys Gly Ser Glu Leu Ser Thr Gln Asp Tyr Pro

50            55            60

35

Asn Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65            70            75            80

ES 2 777 778 T3

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95

5 Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

10

<210> 38

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 1321 de CTLA-4

<400> 38

20

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ser

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

25

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

30 Ala Ala Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Arg

65 70 75 80

35

Gly Leu Arg Ala Ser Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95



ES 2 777 778 T3

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile  
100 105 110

5 Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp  
115 120

<210> 39

<211> 124

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 0943 de CTLA-4

15

<400> 39

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile  
1 5 10 15

20

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val  
20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

25

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ser Thr Phe Leu Asp Asp Ser  
50 55 60

30 Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Arg

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Leu Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95

35

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile  
100 105 110

ES 2 777 778 T3

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

5 <210> 40

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia sintética: Variante 0898 de CTLA-4

<400> 40

15 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Val

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

20

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Pro Asp Asp Ser

25 50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

30 Gly Leu Arg Ala Leu Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

35

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

ES 2 777 778 T3

<210> 41

<211> 124

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 1319 de CTLA-4

10

<400> 41

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

20

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Ser Glu Leu Ser Thr Gln Asp Tyr Pro

50 55 60

25

Asn Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95

30

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

35

115 120

<210> 42

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Secuencia sintética: Variante 1115 de CTLA-4

<400> 42

10 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Val

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

15

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser

20 50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

25 Gly Leu Arg Ala Gln Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

30

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 43

35 <211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 777 778 T3

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 1299 de CTLA-4

5 <400> 43

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Arg

1 5 10 15

10 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Thr Asn Pro Ser Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

15

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ala Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

20 65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Gln Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95

25 Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

30

<210> 44

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 1249 de CTLA-4

ES 2 777 778 T3

<400> 44

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Arg

5 1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

10 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Pro Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

15

Ile Cys Thr Gly Thr Met Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Thr Val Glu Leu

20 85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asp Gly Thr Gln Ile

100 105 110

25 Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 45

<211> 124

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 1303 de CTLA-4

35

<400> 45

# ES 2 777 778 T3

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

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val  
5            20            25            30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys  
35            40            45

10 Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ala Thr Phe Leu Asp Asp Ser  
50            55            60

Ile Cys Thr Gly Thr His Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln  
65            70            75            80

15 Gly Leu Arg Ala Arg Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu  
85            90            95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile  
20            100            105            110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp  
115            120

25 <210> 46  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Secuencia sintética: Variante 1114 de CTLA-4

<400> 46

35 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Arg  
1            5            10            15

ES 2 777 778 T3

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

5 35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

10 Ile Cys Thr Gly Thr Thr Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Lys Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95

15

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

20 115 120

<210> 47

<211> 124

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 1227 de CTLA-4

30 <400> 47

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ser

1 5 10 15

35 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Ser Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30



ES 2 777 778 T3

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ala Thr Phe Leu Asp Asp Ser

5 50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

10 Gly Leu Arg Ala Gln Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys His Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

15

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 48

20 <211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia sintética: Variante 0722 de CTLA-4

<400> 48

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Val

30 1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

35 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Gly Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

ES 2 777 778 T3

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ser Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

5 Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Glu Val Glu Leu

85 90 95

10

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Arg Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

15 115 120

<210> 49

<211> 124

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 0645 de CTLA-4

25 <400> 49

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Thr

1 5 10 15

30 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

35

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Ala Phe Pro Asp Asp Ser

50 55 60

ES 2 777 778 T3

Val Cys Thr Gly Thr Thr Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65            70            75            80

5 Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Glu Val Glu Leu

85            90            95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100           105           110

10

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115           120

<210> 50

15 <211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Secuencia sintética: Variante 0636 de CTLA-4

<400> 50

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

25 1            5            10           15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20            25            30

30 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35            40            45

Ala Ala Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Ser Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50            55            60

35

Val Cys Thr Gly Thr Thr Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65            70            75            80

ES 2 777 778 T3

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu

85 90 95

5 Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Val Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

10

<210> 51

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 0745 de CTLA-4

<400> 51

20

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Thr

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

25

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

30 Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Gly Glu Ser Thr Phe Leu Asp Asp Ser

50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

35

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Glu Val Glu Leu

85 90 95

ES 2 777 778 T3

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Arg Gly Val Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

5 Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 52

<211> 123

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 0637 de CTLA-4

15

<400> 52

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

20

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

25

35 40 45

Ala Ala Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Gly Asp Ser Thr

50 55 60

30 Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly

65 70 75 80

Leu Arg Ala Met Asp Ser Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met

85 90 95

35

Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr

100 105 110

ES 2 777 778 T3

Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

5 <210> 53

<211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Secuencia sintética: Variante 0788 de CTLA-4

<400> 53

15 Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Ile

20 25 30

20

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ser Thr Phe Leu Asp Asp Ser

25 50 55 60

Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Arg

65 70 75 80

30 Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Met Val Glu Leu

85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Gln Gly Ile Gly Ser Gly Thr Gln Ile

100 105 110

35

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

ES 2 777 778 T3

<210> 54

<211> 123

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 0701 de CTLA-4

10 <400> 54

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

1 5 10 15

15 Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Glu Thr Glu Val Cys

35 40 45

20

Ala Ala Tyr Met Val Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Gly Asp Ser Ile

50 55 60

Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly

25 65 70 75 80

Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met

85 90 95

30 Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr

100 105 110

Val Phe Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

35

<210> 55

<211> 124

ES 2 777 778 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Secuencia sintética: Variante 0439 de CTLA-4

<400> 55

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile

10 1 5 10 15

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

15 Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Ser Glu Leu Ser Thr Gln Asp Tyr Pro

50 55 60

20

Asn Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu

25 85 90 95

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

30 Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

115 120

<210> 56

<211> 233

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens



ES 2 777 778 T3

<400> 56

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

5

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

10 35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

50 55 60

15 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

85 90 95

20

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

100 105 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

25 115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met

130 135 140

30 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

165 170 175

35

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

180 185 190

ES 2 777 778 T3

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val

195 200 205

5 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

225 230

10

<210> 57

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 1 de la región Fc

<400> 57

20

Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro

1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

25

20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

35 40 45

30 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

65 70 75 80

35

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

85 90 95

ES 2 777 778 T3

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
100 105 110

5 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
130 135 140

10

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
15 165 170 175

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
180 185 190

20 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
195 200 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
210 215 220

25

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

<210> 58

30 <211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia sintética: Variante 2 de la región Fc

<400> 58

ES 2 777 778 T3

Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro

1            5            10            15

5 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

20            25            30

Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val

35            40            45

10

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

50            55            60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

15 65            70            75            80

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

85            90            95

20 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

100            105            110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

115            120            125

25

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

130            135            140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

30 145            150            155            160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

165            170            175

35 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

180            185            190

ES 2 777 778 T3

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
195 200 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
5 210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

10 <210> 59  
<211> 233  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia sintética: Variante 3 de la región Fc  
  
<400> 59

20 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10 15

Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
20 25 30

25 Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val  
35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
30 50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
65 70 75 80

35 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
85 90 95

ES 2 777 778 T3

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
100 105 110

Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
5 115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
130 135 140

10 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
165 170 175  
15

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
20 195 200 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
210 215 220

25 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
225 230

<210> 60

<211> 230

30 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Variante 4 de la región Fc

35

<400> 60

ES 2 777 778 T3

Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu

1            5            10            15

Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

5            20            25            30

Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

35            40            45

10 Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

50            55            60

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

65            70            75            80

15

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

85            90            95

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

20            100            105            110

Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu

115            120            125

25 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn

130            135            140

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

145            150            155            160

30

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

165            170            175

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg

35            180            185            190

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys

# ES 2 777 778 T3

195            200            205

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

210            215            220

5

Ser Leu Ser Leu Gly Lys

225            230

<210> 61

10 <211> 61

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Secuencia sintética: Oligonucleótido de superposición  
para la construcción de la colección de presentación de  
ribosomas por mutagénesis en puntos de hipermutabilidad

<400> 61

20 gagatatac catggccgca atgcacgtgg cccagcctgc tgtgtactg gccagcagcc 60

g

61

<210> 62

25 <211> 80

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Secuencia sintética: Oligonucleótido de superposición  
para la construcción de la colección de presentación de  
ribosomas por mutagénesis en puntos de hipermutabilidad

<220>

35 <221> misc\_feature

<222> (25)..(26)

<223> n es a, c, g, o t



<220>

<221> misc\_feature

<222> (52)..(53)

5 <223> n es a, c, g, o t

<400> 62

cggacctcag tggctttgcc tggsnntgca tactcacaca caaagctggc snngcctcgg 60

10 ctgctggcca gtaccacagc 80

<210> 63

<211> 70

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Oligonucleótido de superposición  
para la construcción de la colección de presentación de

20 ribosomas por mutagénesis en puntos de hipermutabilidad

<400> 63

ggcaaagcca ctgaggtccg ggtgacagtg cttcggcagg ctgacagcca ggtgactgaa 60

25 gtctgtgctgg 70

<210> 64

<211> 70

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: Oligonucleótido de superposición  
para la construcción de la colección de presentación de

35 ribosomas por mutagénesis en puntos de hipermutabilidad

<220>

## ES 2 777 778 T3

<221> misc\_feature

<222> (26)..(27)

<223> n es a, c, g, o t

5 <400> 64

gcagatggaa tcacttagga aggtsnnctc attcccatc atgtaggtg cgcacagac 60

ttcagtcacc

70

10 <210> 65

<211> 72

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Secuencia sintética: Oligonucleótido de superposición  
para la construcción de la colección de presentación de  
ribosomas por mutagénesis en puntos de hipermutabilidad

20 <220>

<221> misc\_feature

<222> (29)..(30)

<223> n es a, c, g, o t

25 <400> 65

cctagatgat tccatctgca cgggcaccnn sagtggaaat caagtgaacc tcactatcca 60

aggactgagg gc

72

30 <210> 66

<211> 59

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Secuencia sintética: Oligonucleótido de superposición  
para la construcción de la colección de presentación de

ribosomas por mutagénesis en puntos de hipermutabilidad

<220>

<221> misc\_feature

5 <222> (18)..(19)

<223> n es a, c, g, o t

<220>

<221> misc\_feature

10 <222> (42)..(43)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 66

ggtacatgag ctccacsng cagatgtaga gtcccggtc snntgccctc agtccttg 59

15

<210> 67

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Secuencia sintética: Oligonucleótido de superposición  
para la construcción de la colección de presentación de  
ribosomas por mutagénesis en puntos de hipermutabilidad

25

<400> 67

gtggagctca tgtaccacc gccatactac c 31

<210> 68

30 <211> 124

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Secuencia sintética: polipéptido de CTLA-4

<220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa es Arg, Ile, Ser o Val

5 <220>

<221> VARIANTE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa es Thr o Ala

10 <220>

<221> VARIANTE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es Ser o Gly

15 <220>

<221> VARIANTE

<222> (54)..(54)

<223> Xaa es Met o Lys

20 <220>

<221> VARIANTE

<222> (56)..(56)

<223> Xaa es Asn o Ser

25 <220>

<221> VARIANTE

<222> (58)..(58)

<223> Xaa es Ala, Leu o Gly

30 <220>

<221> VARIANTE

<222> (59)..(59)

<223> Xaa es Thr o Ser

35 <220>

<221> VARIANTE

<222> (60)..(60)

<223> Xaa es Phe o Thr

<220>

<221> VARIANTE

5 <222> (61)..(61)

<223> Xaa es Leu o Gln

<220>

<221> VARIANTE

10 <222> (63)..(63)

<223> Xaa es Asp o Tyr

<220>

<221> VARIANTE

15 <222> (64)..(64)

<223> Xaa es Ser o Pro

<220>

<221> VARIANTE

20 <222> (65)..(65)

<223> Xaa es Ile, Asn o Asp

<220>

<221> VARIANTE

25 <222> (70)..(70)

<223> Xaa es Ala o Ser

<220>

<221> VARIANTE

30 <222> (80)..(80)

<223> Xaa es Gln o Arg

<220>

<221> VARIANTE

35 <222> (85)..(85)

<223> Xaa es Gln, Met o Ser

ES 2 777 778 T3

<220>

<221> VARIANTE

<222> (93)..(93)

<223> Xaa es Gln o His

5

<400> 68

Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Xaa

1 5 10 15

10

Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Xaa Asn Pro Xaa Lys Ala Thr Glu Val

20 25 30

Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys

15

35 40 45

Ala Ala Thr Tyr Met Xaa Gly Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa

50 55 60

20

Xaa Cys Thr Gly Thr Xaa Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Xaa

65 70 75 80

Gly Leu Arg Ala Xaa Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Xaa Val Glu Leu

85 90 95

25

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

100 105 110

Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp

30

115 120

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

35

<213> Secuencia artificial

<220>

# ES 2 777 778 T3

<223> Secuencia sintética: motivo bucle 4 de CTLA-4

<400> 69

5 Ser Thr Gln Asp Tyr Pro Asn

1 5

<210> 70

<211> 19

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

15 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

Ala Pro Glu

20

<210> 71

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Secuencia sintética: región Fc de IgG1 humana modificada  
que comprende una bisagra

30 <400> 71

Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro

1 5 10 15

35 Ala Pro Glu

ES 2 777 778 T3

<210> 72

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética: marca FLAG 10xhis

10 <400> 72

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ala His His His His His His

1            5                    10                    15

15 His His His His

20



**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido de CTLA-4 aislado, donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que es una variante de la SEQ ID NO: 35, donde la variante comprende la siguiente combinación de mutaciones:  
R en I16; T en A24; N en S25; S en G27; A en L58; A en S70; Q en M85; y Q en K93,
- 5 donde el polipéptido de CTLA-4 tiene una mayor afinidad para unirse al CD80 humano, mayor potencia y/o mayor estabilidad en comparación con el CTLA-4 de tipo natural de la SEQ ID NO: 35.
2. Un polipéptido de CTLA-4 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 43.
3. Un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que tiene una afinidad de 50 nM o menos para unirse al CD80 humano, donde la afinidad es KD tal como se determina por resonancia de plasmones superficiales,  
10 opcionalmente donde el polipéptido tiene una afinidad de 20 nM o menos para unirse al CD80 humano.
4. Un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el polipéptido tiene una afinidad mayor que la del CTLA-4 de tipo natural (SEQ ID NO: 35) para unirse al CD86 humano.
5. Un polipéptido aislado de CTLA-4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que tiene una afinidad  
15 al menos 10 veces mayor para unirse a CD80 que para unirse a CD86, opcionalmente donde el polipéptido tiene una afinidad al menos 50 veces mayor para unirse a CD80 que para unirse a CD86.
6. Un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, conjugado con una secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG,  
opcionalmente donde la región Fc de IgG es una región Fc de IgG1 humana modificada para reducir la función efectora de la región Fc y comprende una región bisagra de la región Fc de IgG1 humana natural,  
20 opcionalmente donde la secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG comprende una región Fc de IgG1 humana en la cual uno de los dos grupos siguientes de residuos, o ambos, se sustituyen de la siguiente manera:  
F en el residuo 20; E en el residuo 21; S en el residuo 117; e  
Y en el residuo 38, T en el residuo 40, E en el residuo 42,  
donde la numeración de los residuos se define en referencia a la SEQ ID NO: 56.
- 25 7. Un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con la reivindicación 6, donde la secuencia de aminoácidos de la región Fc de IgG comprende la SEQ ID NO: 59.
8. Un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el polipéptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13.
9. Un polipéptido de CTLA-4 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el polipéptido está en un multímero, opcionalmente donde el polipéptido de CTLA-4 está en un dímero o un tetrámero, y opcionalmente, cuando el polipéptido está en un tetrámero, el tetrámero comprende dos pares de polipéptidos de CTLA-4, donde cada par comprende un polipéptido de CTLA-4 fusionado con una región constante de la cadena ligera de un anticuerpo y un polipéptido de CTLA-4 fusionado con una región constante de la cadena pesada de un anticuerpo.
- 30 10. Una célula hospedadora que contiene un ácido nucleico, donde el ácido nucleico codifica un polipéptido de CTLA-4 o una proteína de fusión CTLA-4-región Fc de IgG de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
- 35 11. Una composición que comprende:  
un polipéptido de CTLA-4 o una proteína de fusión CTLA-4-región Fc de IgG de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9; y  
uno o más excipientes farmacéuticos.
- 40 12. Una composición de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende el polipéptido de CTLA-4 o una proteína de fusión CTLA-4-región Fc de IgG con una concentración de al menos 70 mg/mL, opcionalmente con una concentración de al menos 100 mg/mL.
13. Un polipéptido de CTLA-4 o una proteína de fusión CTLA-4-región Fc de IgG de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una composición de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, para utilizar en la terapia de un paciente  
45 por administración subcutánea o intravenosa.
14. Un polipéptido de CTLA-4 o una proteína de fusión CTLA-4-región Fc de IgG de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una composición de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, para utilizar en un método de tratamiento

de la artritis reumatoide, esclerosis múltiple, asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico o rechazo del trasplante.

Numeración de la secuencia	NOMBRE	SEQ ID
CUA-4 de tipo natural		
Variante 1315		35
Variante 1322		36
Variante 1321		37
Variante 0943		38
Variante 0838		39
Variante 1319		40
Variante 1115		41
Variante 1239		42
Variante 1249		43
Variante 1303		44
Variante 1114		45
Variante 1227		46
Variante 0636		47
Variante 0673		48
Variante 0738		49
Variante 0701		50
Variante 0439		51

Numeración de la secuencia (parte superior) y numeración de acuerdo con la entrada P164.0 de Swigo Job (parte inferior)

NOMBRE	SEQ ID
Región Fc de I961	56
Variante 1 de la región Fc	57
Variante 2 de la región Fc	58
Variante 3 de la región Fc	59
Variante 4 de la región Fc	60

Numeración de la secuencia (parte superior) y numeración de acuerdo con la entrada P0165.7 de Swiss-Prot (parte inferior)

Figura 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
M	H	V	A	Q	P	A	V	V	L	A	S	S	R	G	R <sub>16</sub>	A	S	F	V
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	E	Y	R <sub>24</sub>	N	P	R <sub>27</sub>	K	A	T	E	V	R	V	T	V	L	R	Q	A
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
D	S	Q	V	T	E	V	C	A	A	T	Y	M	R <sub>54</sub>	G	R <sub>56</sub>	E	R <sub>58</sub>	R <sub>59</sub>	R <sub>60</sub>
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
R <sub>61</sub>	D	R <sub>63</sub>	R <sub>64</sub>	R <sub>65</sub>	C	T	G	T	R <sub>70</sub>	S	G	N	Q	V	N	L	T	I	R <sub>80</sub>
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
G	L	R	A	R <sub>85</sub>	D	T	G	L	Y	I	C	R <sub>93</sub>	V	E	L	M	Y	P	P
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
P	Y	Y	L	G	I	G	N	G	T	Q	I	Y	V	I	D	P	E	P	C
121	122	123	124																
P	D	S	D																

R<sub>16</sub> = R, I, S O V  
 R<sub>24</sub> = T O A  
 R<sub>27</sub> = S O G  
 R<sub>54</sub> = M O K  
 R<sub>56</sub> = N O S  
 R<sub>58</sub> = A, L O G  
 R<sub>59</sub> = T O S  
 R<sub>60</sub> = F O T  
  
 R<sub>61</sub> = L O Q  
 R<sub>63</sub> = D O Y  
 R<sub>64</sub> = S O P  
 R<sub>65</sub> = I, N O D  
 R<sub>70</sub> = A O S  
 R<sub>80</sub> = Q O R  
 R<sub>85</sub> = Q, M O S  
 R<sub>93</sub> = Q O H

Figura 2

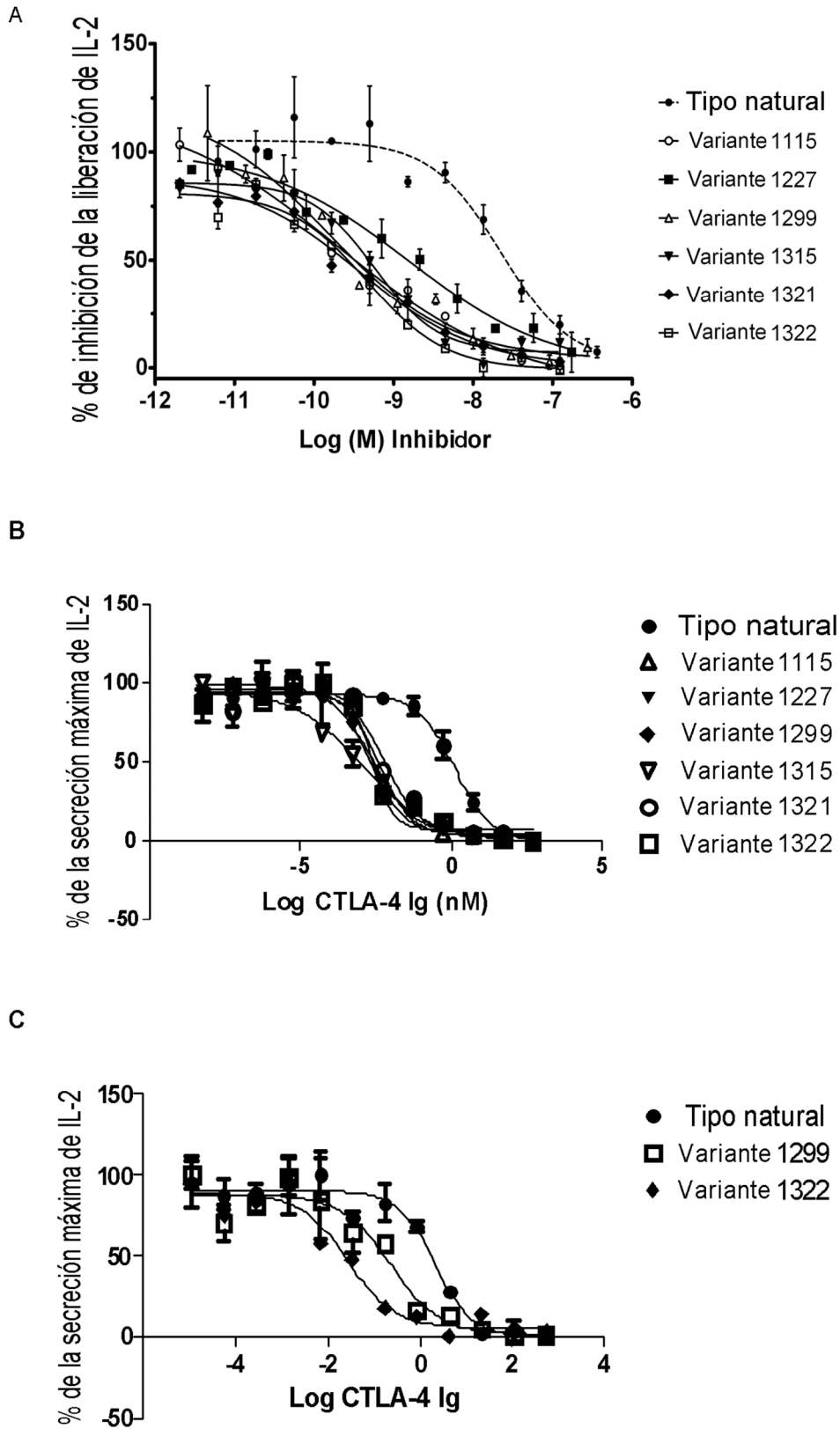
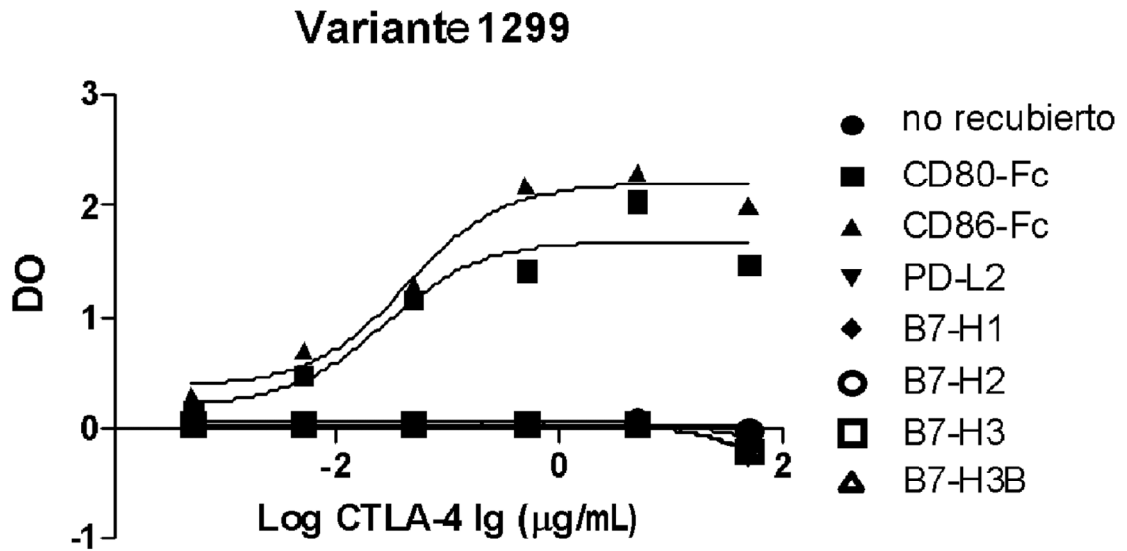


Figura 3

A



B

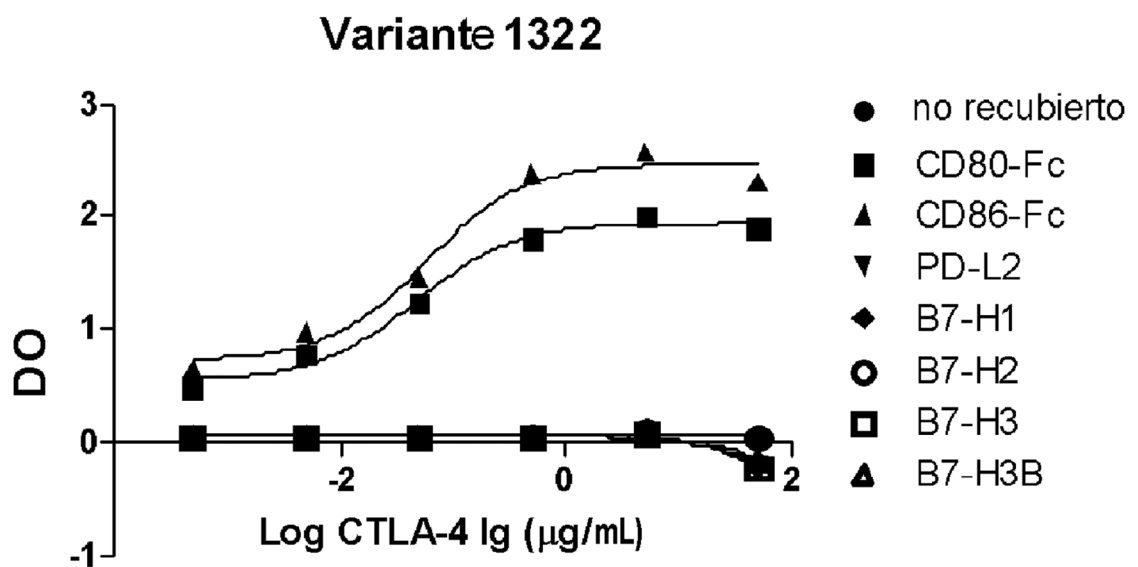


Figura 4

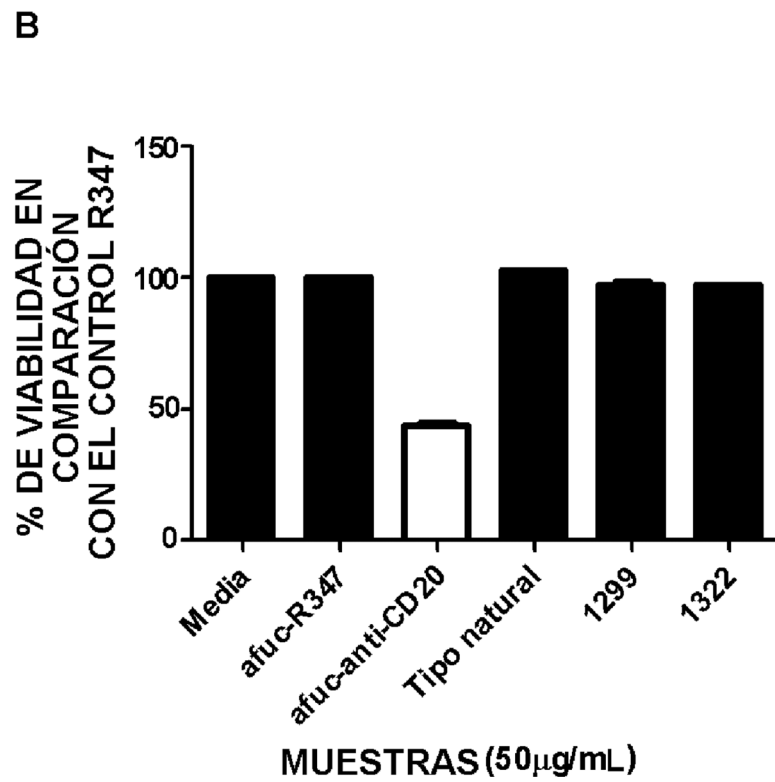
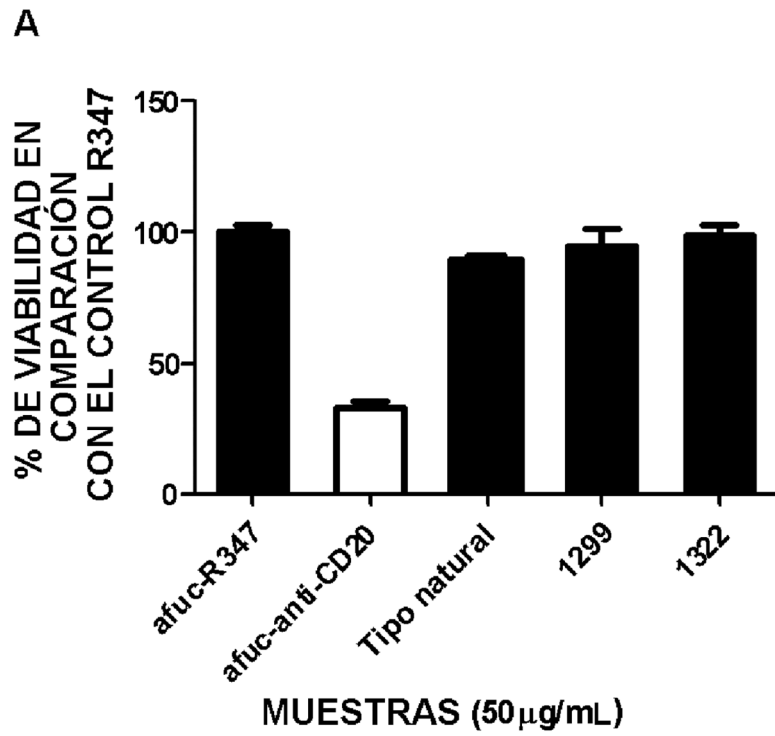


Figura 5

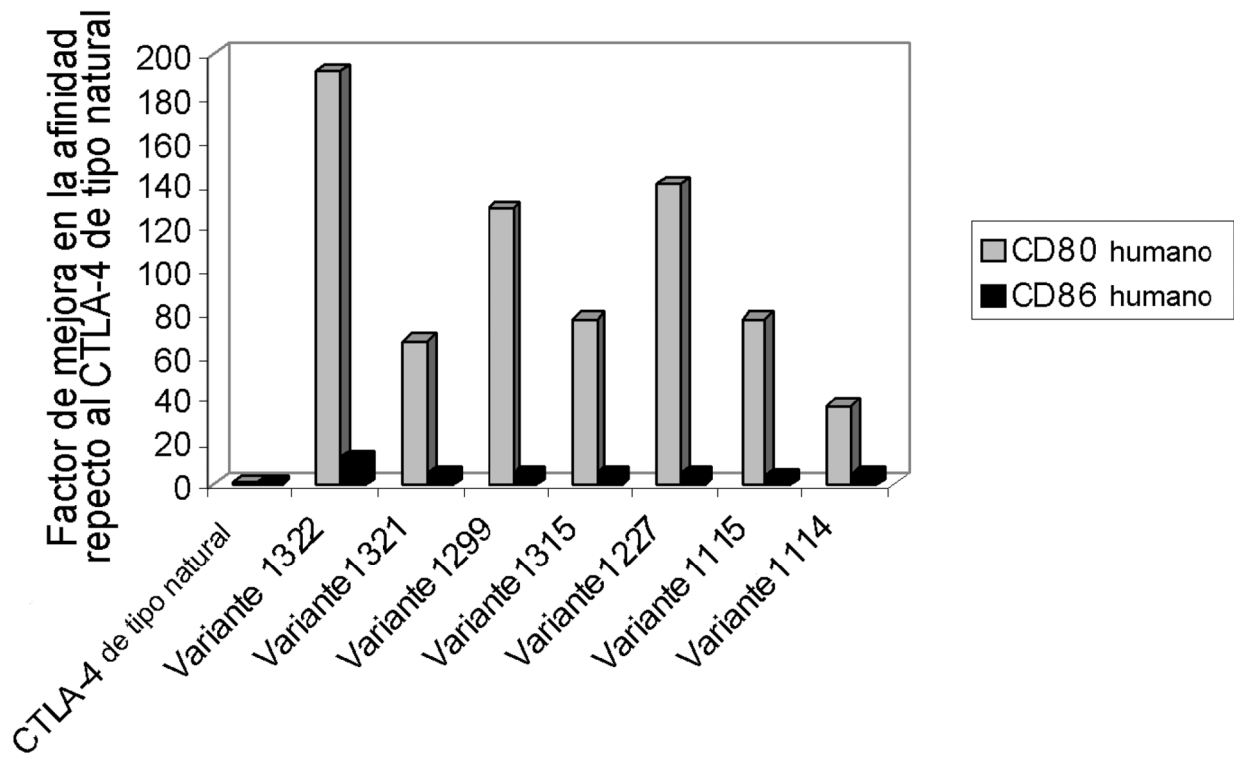
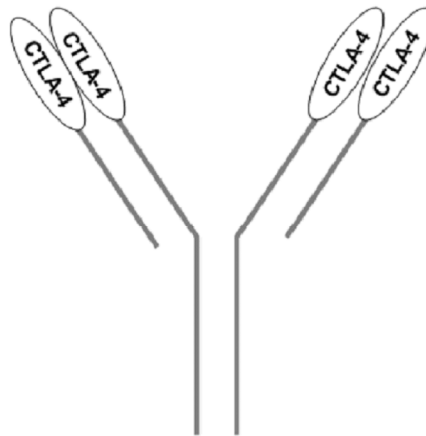
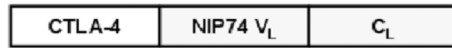
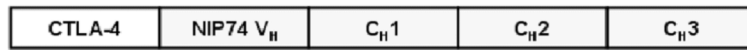


Figura 6



A



B

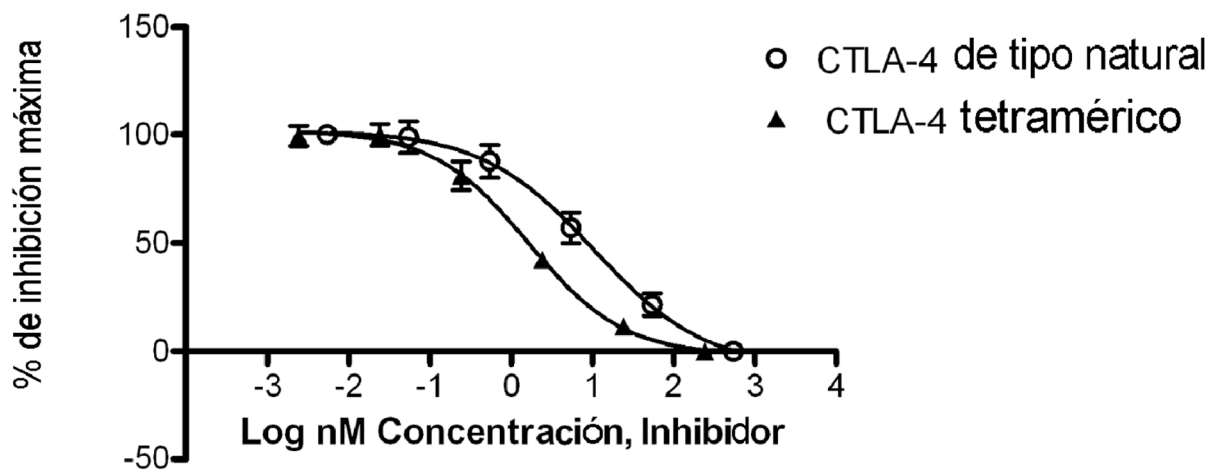


Figura 7