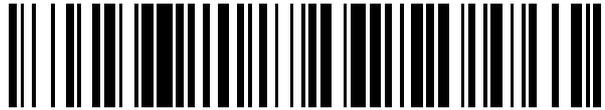


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 424**

51 Int. Cl.:

C07K 14/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012** E 18151718 (6)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020** EP 3357511

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

30 Prioridad:

30.06.2011 US 201161503282 P

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

08.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 810 424 T3

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

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de la activación de células T

Antecedentes de la invención

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

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

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

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

Sumario de la invención

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

55 La reticulación del antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), acoplado al ligando, al TCR con una proteína de fusión biespecífica (BsB), que comprende un CD80 de ratón mutante y antígeno 3 de activación del linfocito, en una MLR alogénica, atenuó la señalización del TCR y la diferenciación directa de células T hacia las células T reguladoras (Tregs) Foxp3⁺. Como se describe aquí, las Tregs específicas de un antígeno pueden inducirse también en una

configuración específica para un antígeno. El tratamiento de ratones diabéticos no obesos (NOD) con un corto tratamiento de BsB retrasó de forma moderada el comienzo de la diabetes tipo 1 autoinmunitaria (DT1) con un aumento temporal de Tregs en sangre. Sin embargo, un tratamiento más largo de animales NOD con BsB retrasó de forma significativa el comienzo de la enfermedad, además de reducir la incidencia de animales que se presentan con diabetes. El análisis histopatológico de los páncreas de ratones tratados con BsB que permanecieron no diabéticos reveló la presencia de Tregs que se entremezclaron con otras células T CD3⁺ y leucocitos que no son células T alrededor de los islotes. Esta peri-insulitis se asoció con insulitis invasiva mínima y la no destacada destrucción de las células β que producen insulina. De este modo, las proteínas bifuncionales capaces de acoplar CTLA-4 y MHCII y coligarlo de forma indirecta al TCR pueden inducir Tregs específicas de antígenos in vivo para proteger a los ratones de DT1 u otras enfermedades autoinmunitarias.

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

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

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

En el compuesto biológico biespecífico descrito aquí, el ligando específico para CTLA-4 y el ligando específico para el complejo pMHC están separados preferiblemente por un conector. El conector puede tomar la forma de una o más de una secuencia de poliaminoácidos y un dominio Fc de anticuerpo. Una secuencia de poliaminoácidos adecuada es G9 (Gly-9).

En diversas realizaciones de los aspectos delineados aquí, el ligando específico para CTLA-4 es CD80, o un mutante del mismo que se muta para aumentar la especificidad para CTLA-4 con respecto a CD28. En una realización, el CD80 mutado comprende una o más mutaciones seleccionadas de W88A, K75G, K75V, S112G, R126S, R126D, G127L, S193A, y S204A, usando la numeración de secuencia en el precursor de CD80 de ratón, o su contrapartida de CD80 humano (W84A, K71G, K71V, S109G, R123S, R123D, G124L, S190A, y S201A), y además R63A, M81A, N97A, E196A.

En una realización, la proteína de fusión biespecífica comprende CD80, que comprende la mutación W84A (humana) o W88A (ratón).

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

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

El gen-3 de activación del linfocito (LAG-3), un ligando natural de MHCII, se seleccionó como el otro componente de unión de la proteína de fusión biespecífica (Baixeras et al., (1992) J. Exp. Med. 176:327-337; Triebel et al., (1990) J. Exp. Med. 171:1393-1405). Se muestra que una proteína de fusión con dicha bi-funcionalidad inhibe de forma efectiva la activación de células T y estimula la producción de las citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF-β. De forma más importante, esta proteína de fusión biespecífica también dirigió la diferenciación de células T a Tregs Foxp3⁺ altamente supresoras. Esto no ocurrió cuando se usó en cambio el inhibidor co-estimulador bien establecido CTLA-4Ig (Bluestone et al., (2006) Immunity 24:233-238; Linsley y Nadler (2009) Immunol. Rev. 229:307-321). Por lo tanto, el acoplamiento temprano de CTLA-4 y la reticulación de CTLA-4 al TCR durante la activación de células T podría influir

de forma activa en la diferenciación de células T. Dichas proteínas de fusión biespecíficas podrían representar por consiguiente una nueva clase de compuestos biológicos que podrían usarse para controlar las respuestas excesivas de células T en las enfermedades autoinmunitarias.

5 En un segundo aspecto de la invención, se proporciona el uso de un compuesto biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC según el primer aspecto de la invención, para la inducción de inmunotolerancia de una célula T poniendo en contacto dicha célula T con una célula presentadora de antígeno que presenta un péptido derivado de dicho antígeno complejado con una molécula de MHC y dicho compuesto biológico biespecífico.

10 En un tercer aspecto, se proporciona el uso de un compuesto biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC según el primer aspecto de la invención, en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad autoinmunitaria y rechazo de trasplante.

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

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

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

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

Descripción de las figuras

35 Figura 1. Diseños de BsB y BsBΔ. (A) Dibujos esquemáticos de las proteínas de fusión BsB (compuestos biológicos biespecíficos) y BsBΔ. (B) Dibujo esquemático de pMHCII, del TCR y las moléculas co-estimuladoras en la sinapsis inmunitaria, además del esquema propuesto para la reticulación, mediada por BsB, de CTLA-4 al TCR por medio del complejo trimolecular CTLA-4/MHC 11/TCR. La proteína de fusión se acopla a CTLA-4 y liga indirectamente al TCR por medio de la unión a MHCII en la sinapsis inmunitaria. Los dos lados sólidos del triángulo indican reticulación de MHCII y CTLA-4 además de MHCII y TCR; el lado discontinuo representa la unión de CTLA-4 a TCR. La línea de puntos indica la inhibición de la señalización de TCR por CTLA-4 acoplado a BsB. C. El dibujo esquemático muestra que la acción de BsBΔ es similar a la de BsB excepto que es incapaz de ligarse al TCR.

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

45 Figura 3. Inducción de Tregs Foxp3⁺ y producción de IL-10 y TGF-β mediante BsB. (A) Las reacciones mixtas de linfocitos alogénicas se establecieron como se describe en la leyenda de la Figura 2, usando células CD4⁺CD62L^{alto}CD25⁻GFP⁺ no tratadas anteriormente que se habían aislado de ratones con genes externos insertados de Foxp3-EGFP en presencia de los constructos de ensayo. Cinco días después de la activación, las células T CD4⁺ se analizaron para la expresión de GFP por citometría de flujo. Las Tregs se agruparon como células GFP⁺ y CD25⁺. Solo el tratamiento con BsB llevó a la expresión de GFP, que indica la inducción de Tregs Foxp3⁺ (panel izquierdo medio). Los medios de cultivo se recogieron para análisis de citocinas (paneles derechos), que revelaron niveles elevados de IL-10 y TGF-β en presencia de BsB. Los datos son representativos de numerosos estudios independientes aunque similares. (B) La necesidad de TGF-β autocrino para la inducción de Treg se indica por el bloqueo completo de la inducción de Treg en presencia de un anticuerpo de bloqueo para TGF-β, mientras el Ab de control no impactó de forma notable en la inducción de Treg.

Figura 4. Inducción mediada por BsB de Tregs específicas de antígeno *in vitro*. (A) Inducción *in vitro* de Tregs específicas de Ova₂₃₃₋₃₃₉. Las células T OT-II no tratadas anteriormente se mezclaron con APC singénicas activadas con LPS e irradiadas, en presencia de 0,5 µg/ml de péptido Ova₂₃₃₋₂₃₉. Se añadieron entonces mlgG2a de control, BsB, y BsB más un anticuerpo anti-TGF-β (αTGF-β) y se ensayaron como se indica (paneles izquierdos). Las células se cultivaron durante 5 días y después se marcaron con anticuerpos anti-CD25 y anti-Foxp3 antes de analizarse por citometría de flujo. Los niveles de IL-2, IL-10 y TGF-β en los medios de cultivos se evaluaron por ELISA (paneles derechos). (B) Monitorización de la proliferación de Tregs inducidas. Los estudios se realizaron como en A excepto que células T OT-II no tratadas anteriormente se pre-marcaron con CFSE antes de mezclarlas con las APCs. Las células se agruparon en canales fluorescentes de Foxp3 y CFSE.

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

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

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

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

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

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

Figura 11. El tratamiento de ratones NOD con BsB retrasó el comienzo de DT1 en un paradigma de tratamiento de prevención temprana. (A) Niveles de Tregs Foxp3⁺ en la sangre de ratones tratados con BsB (círculos negros, n=10), disolución salina (triángulos negros, n=10), CTLA-4Ig (cuadrados negros, n=10) e IgG2a de ratón

(cuadrados blancos, n=10). No se detectó aumento en el número de Tregs Foxp3⁺ después de dos semanas de tratamiento con BsB cuando se compara con los controles tratados con disolución salina o mlgG2a. Sin embargo, el tratamiento con CTLA-4Ig dio como resultado una disminución estadísticamente significativa en el número de Tregs Foxp3⁺ en la sangre. (B) Incidencias acumulativas de diabetes manifiesta en animales tratados con BsB o controles. El tratamiento con BsB dio como resultado un retraso significativo en el comienzo de DT1 cuando se compara con los grupos de control tratados con disolución salina o IgG2a de ratón antes de 24 semanas de edad (p=0,04). Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos al final del estudio. Los datos representan uno de dos estudios separados con resultados similares, con un total de 26 ratones NOD en cada grupo.

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

Descripción detallada de la invención

A menos que se señale de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen los mismos significados que se entienden normalmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Cualesquiera métodos y materiales con función similar o equivalente a los descritos aquí se pueden usar en la práctica o el ensayo de la presente invención. Los métodos, dispositivos y materiales adecuados para cada uso se describen ahora.

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

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

Como se usa aquí, la expresión "fragmentos de anticuerpo" se refiere a porciones de un anticuerpo intacto de longitud completa – tal como una región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla (por ejemplo scFv); fragmentos de anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, triespecíficos y multiespecíficos (por ejemplo, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos); proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión; anticuerpos camelizados; minicuerpos; anticuerpos recombinantes quelantes; tricuerpos o bicuerpos; intracuerpos; nanocuerpos; compuestos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), anticuerpos que contienen V_{HH}; y cualquier otro polipéptido formado a partir de fragmentos de anticuerpo, por ejemplo como se describe adicionalmente a continuación.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20

Antígeno 4 asociado a linfocito citotóxico (CTLA-4)

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

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

35 Al promover la reticulación de CTLA-4 al TCR durante la fase temprana de la activación de células T, se generó una proteína de fusión biespecífica (designada como "BsB") que comprende un CD80 mutante (CD80w88a) y el gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3). BsB se diseñó para acoplar simultáneamente CTLA-4 y MHCII en la sinapsis inmunitaria y así reticularla indirectamente al TCR por medio del emparejamiento similar de MHCII con el TCR (Karman et al., (2012) *J Biol Chem* epub 2012 Feb 15). En una MLR alogénica, se mostró que BsB era eficaz inhibiendo la activación de células T. Sorprendentemente, BsB también indujo la producción de IL-10 y TGF-β, y promovió la diferenciación de células T que experimentan la activación a Tregs. IL-10 puede ejercer amplias propiedades supresoras inmunitarias a través de su capacidad para controlar la activación de macrófagos y células dendríticas (DCs), además de auto-regular las células Th1 (Ohata et al., (2007) *Arthritis Rheum* 56:2947-2956). TGF-β puede actuar como un inhibidor de diferenciación de células T (Kehrl et al., (1986) *J Exp Med* 163:1037-1050), activación de macrófagos (Tsunawaki et al., (1988) *Nature* 334:260-262; Wahl et al., (1990) *Ann NY Acad Sci* 593:188-196) y

60

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

Células T reguladoras (Tregs)

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

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

Diabetes tipo 1

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

Anticuerpos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15 Diferentes equipos de investigación han conectado anteriormente polipéptidos con restos de cisteína a una estructura molecular sintética (Kemp, D. S. y McNamara, P. E., (1985) *J. Org. Chem.* Timmerman, P. et al., (2005) *ChemBioChem.* 6(5):821-4). Meloen y colaboradores habían usado tris(bromometil)benceno y moléculas relacionadas para la ciclación rápida y cuantitativa de bucles peptídicos múltiples en andamiajes sintéticos para el mimetismo estructural de superficies de proteína (Timmerman, P. et al., (2005) *ibid*). Los métodos para la generación de fármacos candidatos en los que dichos compuestos se generan uniendo polipéptidos que contienen cisteína a un andamiaje molecular, como por ejemplo tris(bromometil)benceno, se describen en los documentos WO 2004/077062 y WO 2006/078161. La selección de dichas moléculas usando la tecnología de presentación se describe en el documento 20 WO 2009/098450. Las realizaciones específicas duales se describen además en el documento WO 2010/089117.

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

25 Producción de anticuerpos

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

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

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

50 Puede proporcionarse un promotor para la expresión en una célula hospedante adecuada. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, un promotor puede unirse de forma operable a un ácido nucleico que codifica una inmunoglobulina o cadena de inmunoglobulina humanizada, de manera que dirige la expresión del polipéptido codificado. Existe una variedad de promotores adecuados para hospedantes procariontas y eucariotas. Los promotores procariontas incluyen promotores lac, tac, T3, T7 para *E. coli*; 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, por ejemplo enolasa, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa 6 fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, y glucocinasa. Los promotores eucariotas incluyen promotores de levadura inducibles tales como alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína, y enzimas responsables del metabolismo de nitrógeno o utilización de maltosa/galactosa; promotores de ARN polimerasa II, que incluyen promotores víricos tales como polioma, viruela aviar y adenovirus (por ejemplo,

adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular, el promotor del gen temprano inmediato), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, promotor del virus del sarcoma de rous (RSV), y los promotores temprano o tardío del virus 40 del simios y promotores no víricos tales como EF-1 alfa (Mizushima y Nagata (1990) *Nucleic Acids Res.* 18(17):5322). Los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar el promotor apropiado para expresar un anticuerpo humanizado o porción del mismo de la invención.

Cuando sea apropiado, por ejemplo para la expresión en células de eucariotas superiores, pueden incluirse elementos potenciadores adicionales en vez de o además de los encontrados situados en los promotores descritos anteriormente. Secuencias potenciadoras para mamíferos adecuadas incluyen elementos potenciadores procedentes de globina, elastasa, albúmina, fetoproteína, metalotionina, e insulina. De forma alternativa, se puede usar un elemento potenciador procedente de un virus de célula eucariota tal como potenciador del SV40, potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, potenciador del polioma, potenciador baculovírico, o el locus de IgG2a murina (véase el documento WO 04/009823). Aunque dichos potenciadores están situados típicamente en el vector en un sitio en dirección 5' del promotor, también pueden situarse en otro sitio, por ejemplo en la región no traducida o en dirección 3' de la señal de poliadenilación. La elección y posición del potenciador puede basarse en la compatibilidad con la célula hospedante usada para la expresión.

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

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

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

Los anticuerpos según esta invención pueden producirse, por ejemplo, mediante la expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican el anticuerpo en una célula hospedante adecuada. La célula hospedante puede producirse usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, los constructos de expresión (por ejemplo, uno o más vectores, por ejemplo un vector de expresión de células de mamífero) descritos aquí pueden introducirse en una célula hospedante adecuada, y la célula resultante puede mantenerse (por ejemplo, en cultivo, en un animal, en una planta) bajo condiciones adecuadas para la expresión del o de los constructos o vectores. Las células hospedantes adecuadas pueden ser procariotas, incluyendo células bacterianas tales como *E. coli* (por ejemplo, cepa DH5aTM (Invitrogen, Carlsbad, CA), células PerC6 (Crucell, Leiden, NL), *B. subtilis* y/u otras bacterias adecuadas; células eucariotas, tales como células fúngicas o de levadura (por ejemplo *Pichia pastoris*, *Aspergillus sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*), u otras células eucariotas inferiores, y células de eucariotas superiores tales como las procedentes de insectos (por ejemplo, células de *Drosophila* Schnieder S2, células de insecto Sf9 (documento WO 94/126087 (O'Connor), células de insecto TN5BI-4 (HIGH FIVETM) (Invitrogen), de mamíferos (por ejemplo células COS, tal como COS-1 (nº de acceso ATCC CRL-1650) y COS-7 (nº de acceso ATCC CRL-1651), CHO (por ejemplo, nº de acceso ATCC CRL-9096), CHO DG44 (Urlaub, G. y Chasin, LA., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(7):4216-4220), 293 (nº de acceso ATCC CRL-1573), HeLa (nº de acceso ATCC CCL-2), CV1 (nº de acceso ATCC CCL-70), WOP (Dailey, L., et al., (1985) *J. Virol.*, 54:739-749), 3T3, 293T (Pear, W. S., et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:8392-8396), células NSO, células SP2/0, células HuT 78, y similares, o de

plantas (por ejemplo, tabaco, lemná (lenteja de agua), y algas). Véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc. (1993). En algunas realizaciones, la célula hospedante no es parte de un organismo multicelular (por ejemplo planta o animal), por ejemplo es una célula hospedante aislada o es parte de un cultivo celular.

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

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

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

La presente invención también se refiere a células que comprenden un ácido nucleico, por ejemplo un vector, de la invención (por ejemplo, un vector de expresión). Por ejemplo, un ácido nucleico (es decir, uno o más ácidos nucleicos) que codifica las cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina humanizada según la invención, o un constructo (es decir, uno o más constructos, por ejemplo uno o más vectores) que comprende dicho o ácidos nucleicos, puede introducirse en una célula hospedante adecuada por un método apropiado a la célula hospedante seleccionada (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, infección), estando el o los ácidos nucleicos operablemente unidos, o uniéndose, a uno o más elementos de control de la expresión (por ejemplo, en un vector, en un constructo creado por procesos en la célula, integrado en el genoma de la célula hospedante). Las células hospedantes pueden mantenerse en condiciones adecuadas para la expresión (por ejemplo, en presencia de un inductor, medios adecuados suplementados con sales apropiadas, factores de crecimiento, antibióticos, suplementos nutricionales,

etc.), por lo que se produce el o los polipéptidos codificados. Si se desea, el anticuerpo humanizado codificado puede aislarse, por ejemplo, de las células hospedantes, medio de cultivo, o leche. Este proceso abarca la expresión en una célula hospedante (por ejemplo, una célula de glándula mamaria) de un animal o planta transgénica (por ejemplo, tabaco) (véase, por ejemplo, el documento WO 92/03918).

5 Ligandos CD80

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

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

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

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

Ligandos LAG-3

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

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

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

Constructos de ligando biespecífico

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

La construcción de ligandos biespecíficos implicó preferiblemente la construcción y expresión de un gen apropiado que codifica el polipéptido deseado. Otros métodos de construcción son mezclando los dos polipéptidos bajo condiciones que permiten el enlace covalente, iónico o hidrófobo. En realizaciones preferidas, comprende enlazar covalentemente los polipéptidos. Cuando se construye una molécula biespecífica que comprende tres componentes, tal como un ligando CTLA-4, un conector y un ligando MHC, dos de los tres pueden combinarse, unirse juntos, y el tercer polipéptido añadirse posteriormente al producto de fusión, y unirse para crear un producto de fusión que comprende los tres polipéptidos.

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

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

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

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

El inserto de ácido nucleico se une de forma operativa a un promotor apropiado, tal como el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp, phoA y tac de *E. coli*, los promotores SV40 temprano y tardío, y los promotores de LTRs retrovirales. Los expertos en la técnica conocen otros promotores adecuados. Los constructos de expresión

contienen además sitios para la iniciación de transcripción, terminación, y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos expresados por los constructos incluye preferiblemente un codón de iniciación de la traducción al comienzo y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) situado de forma apropiada al final del polipéptido a traducir.

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

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

- 15 Entre los vectores preferidos para uso en bacterias incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de QIAGEN, Inc.; vectores pBluescript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene Cloning Systems, Inc.; y ptrc99a, pKK2233, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia Biotech, Inc. Entre los vectores eucariotas preferidos están pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia. Entre los vectores preferidos para uso en la expresión en células de mamífero se incluyen el vector pSG5, pCMV^{SPORT6}, pcDNA, pCEP4, pREP4, pCI, pSI y pBICEP-CMV. Los vectores de expresión preferidos para uso en sistemas de levadura incluyen, pero no están limitados a, pYES2, pYDI, pTEFI/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, pHILD2, pHIL-SI, pPIC3.5K, pPIC9K, y PA0815 (todos disponibles de Invitrogen, Carlsbad, CA).

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

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

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

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

Las SEQ ID NOs: 5 y 6 proporcionan secuencias de ADN y de proteínas humanas en las que la secuencia de tipo salvaje se ha conservado. No se realizan mutaciones, ni a CD80 ni a LAG-3.

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

Aplicaciones terapéuticas

- 55 La supresión de la actividad de células T es deseable en un número de situaciones en las que se garantiza la inmunosupresión, y/o se da una afección autoinmunitaria. Por consiguiente, la selección de la interacción CTLA4/MHC como diana está indicada en el tratamiento de enfermedades que implican una respuesta inmunitaria inapropiada o indeseada, tal como inflamación, autoinmunidad, y afecciones que implican dichos mecanismos. En una realización,

dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad autoinmunitaria y/o inflamatoria. Ejemplos de dichas enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias se describen anteriormente.

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

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

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

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

35 Composiciones farmacéuticas

En una realización preferida, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión biespecífica según la invención, o un ligando o ligandos identificables por un método de ensayo como se define en el aspecto anterior de la invención. Los ligandos pueden ser inmunoglobulinas, péptidos, ácidos nucleicos o pequeñas moléculas, como se explica aquí. Se denominan, en la siguiente explicación, como "compuestos".

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

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

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

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

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

5 Para administrar el ingrediente activo mediante administración distinta de la parenteral, se revestirá por, o se administrará con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el ingrediente activo puede administrarse en un adyuvante, co-administrarse con inhibidores de enzimas o en liposomas. El adyuvante se usa en su sentido más amplio, e incluye cualquier compuesto de estimulación inmunitaria tal como interferón. Los adyuvantes contemplados aquí incluyen resorcinolos, tensioactivos no iónicos tales como polioxi-etileno oleil éter y n-hexadecil-polietileno-éter. Los inhibidores enzimáticos incluyen tripsina pancreática.

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

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

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

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

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

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

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

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

Los principales ingredientes activos se componen para la administración conveniente y eficaz, en cantidades eficaces, con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado en forma de unidad de dosificación. En el caso de composiciones que contengan ingredientes activos suplementarios, las dosificaciones se determinan en referencia a la dosis y manera de administración normales de dichos ingredientes.

55 Para facilitar el suministro de compuestos peptídicos, que incluyen anticuerpos, a las células, los péptidos pueden modificarse para mejorar su capacidad para cruzar una membrana celular. Por ejemplo, el documento US 5.149.782 describe el uso de péptidos fusogénicos, péptidos que forman un canal iónico, péptidos de membrana, ácidos grasos

de cadena larga, y otros agentes de mezcla con la membrana para aumentar el transporte de proteína a través de la membrana celular. Estos y otros métodos también se describen en los documentos WO 97/37016 y US 5.108.921, incorporados aquí como referencia.

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

10 Además, se proporciona un método para tratar una afección asociada con una respuesta inmunitaria aberrante, que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando identificable usando un método de ensayo como se describe anteriormente.

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

Ejemplos

Ejemplo 1

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

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

20
25
30

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

35
40

Ejemplo 2

BsB inhibe la activación de células T en una reacción mixta alogénica de linfocitos.

La capacidad relativa de BsB y BsBΔ para inhibir la activación de células T se evaluó en una reacción mixta alogénica de linfocitos midiendo la producción de IL-2. Las células T CD4⁺CD25⁻CD62L^{alto}CD44^{bajo} no tratadas anteriormente que se habían purificado procedentes de ratones BALB/c se mezclaron con APCs aisladas de ratones C75BL/6 en presencia o ausencia de la BsB o BsBΔ. La IgG2a murina y el CTLA-4Ig, un inhibidor de co-estimulación que se une a CD80/86 y bloquea su unión a CD28, se incluyeron como controles negativo y positivo, respectivamente. La inclusión de BsB pero no de BsBΔ en la reacción mixta de linfocitos inhibió la producción de IL-2 aunque no en el mismo grado que el logrado mediante CTLA-4Ig (Fig. 2). Esta diferencia fue probablemente el resultado de la inhibición de células T mediada por BsB que se dio después de la inhibición mediada por CTLA-4Ig. Más específicamente, para BsB, la inhibición solo se dio después de que CTLA-4 se sobre-regulara después de la activación de células T. La incapacidad de BsBΔ para reducir la producción de IL-2 sugiere fuertemente que el acoplamiento del CTLA-4 solo es insuficiente para evitar la activación de células T debido a que se necesita la reticulación simultánea al TCR. Para excluir la posibilidad de que la porción de LAG-3 de BsB desempeñe un papel en la inhibición de las células T, se evaluó LAG-3Ig en este ensayo y se verificó que no inhibía la activación de células T.

45
50
55

Ejemplo 3

BsB dirige la diferenciación de células T en Tregs.

Se ha mostrado que la terminación temprana de la señalización de TCR por la retirada de la estimulación del antígeno, la inhibición de la señalización de mTOR, la estimulación de TCR sub-óptima debido a un antígeno de baja afinidad, o la co-estimulación débil durante la activación de células T induce la expresión de Foxp3⁺ y desvía la diferenciación de células T hacia un fenotipo Treg (Delgoffe et al., (2009) *Immunity* 30:832-844; Haxhinasto et al., (2008) *J. Exp. Med.* 205:565-574; Sauer et al., (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:7797-7802). Puesto que BsB fuerza el acoplamiento temprano del TCR mediante CTLA-4 inducido por activación con la consecuente atenuación de la señalización de TCR, se evaluó también su capacidad para generar Tregs Foxp3⁺. Las células T CD4⁺CD62L^{alto}GFP⁺ sin tratamiento previo, preparadas a partir de ratones con genes externos insertados Foxp3-EGFP (Haribhai et al., (2007) *J. Immunol* 178:2961-2972), se mezclaron con APCs alogénicas tratadas con LPS en presencia de BsB o BsBΔ. El análisis por citometría de flujo de las células después de cinco días de cultivo reveló un gran número de células T CD4⁺CD25⁺GFP⁺ entre las células tratadas con BsB (Fig. 3A, panel izquierdo medio) pero no entre las células tratadas con IgG2a de ratón (Fig. 3A, panel izquierdo superior) o el control de BsBΔ (Fig. 3A, panel izquierdo inferior), sugiriendo que estas células T CD4⁺CD25⁺GFP⁺ eran Tregs Foxp3⁺. Para confirmar este descubrimiento, se recogieron medios de cultivo celular y se ensayaron para la firma de citocinas de Treg, IL-10 y TGF-β (Cools et al., (2008) *J. Cell Mo/Med.* 12:690-700). Se detectaron grandes cantidades de IL-10 y TGF-β en los medios de células tratadas con BsB (Fig. 3A, paneles izquierdos) pero no en los medios de células tratadas con BsBΔ o mIgG2a. Sorprendentemente, el CTLA-4Ig no indujo la generación de Tregs GFP⁺ o la producción de IL-10 y TGF-β. Sin estar atados a una teoría particular, el mecanismo por el que CTLA-4Ig acorta la respuesta de las células T es diferente del de BsB. LGA-3Ig solo o en combinación con BsBΔ también falló al inducir la generación de Tregs GFP⁺, sugiriendo que la reticulación mediada por BsB de CTLA-4 con el TCR se necesitaba para la inducción de Treg.

Ejemplo 4

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

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

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

Ejemplo 5

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

Para evaluar si las Tregs inducidas por BsB eran funcionalmente supresoras, las Tregs inducidas por BsB y las Tregs inducidas por TGF-β, que servían como un control, se purificaron usando la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), y se mezclaron con células T respondedoras singénicas marcadas con CFSE a diferentes relaciones y APCs alogénicas. Las células se co-cultivaron durante tres días en pocillos de cultivo polarizado o pocillos de cultivo normales, después de lo cual se analizó la proliferación de células T respondedoras usando citometría de flujo. Como se resume en la Fig. 5A, las Tregs inducidas tanto por BsB como por TGF-β cultivadas en pocillos de cultivo normales casi inhibieron completamente la proliferación de las células T respondedoras. La potencia de la actividad supresora de las Tregs inducidas por BsB fue comparable a la de las Tregs inducidas por TGF-β. En contraste, las Tregs generadas por BsB o TGF-β no inhibieron significativamente la proliferación de las células T respondedoras cuando las células T estaban separadas de las Tregs en un pocillo de cultivo polarizado. Sin estar

atados a una teoría particular, la actividad supresora de Treg depende del contacto célula-célula y no estaba mediada por citocinas segregadas u otros factores. Admitiendo esta idea, la inclusión de un anticuerpo contra IL-10 (clon JES5-2A5) en el pocillo de cultivo normal no afectó a la actividad supresora de las Tregs inducidas por BsB o TGF- β (Fig. 5B). La adición de un anticuerpo contra TGF- β 1D11 tampoco afectó a la actividad supresora de las Tregs inducidas por BsB, aunque redujo parcialmente la supresión mediante Tregs inducidas por TGF- β (Fig. 5B).

Ejemplo 6

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

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

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

Ejemplo 7

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

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

Ejemplo 8

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

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

Ejemplo 9

Farmacocinética de BsB en ratones.

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

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

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

30 Ejemplo 10

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

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

La modesta respuesta observada puede haberse debido a la presencia de insulinitis activa en los ratones NOD de 9 semanas de edad antes del comienzo de la terapia. Se ha mostrado que un entorno inflamatorio favorece la conversión de células T activadoras a células Th17 y suprime su conversión a Tregs. También se ha mostrado que las citocinas inflamatorias tales como IL-6 o IL-4 inhiben la conversión a Tregs y promueven la pérdida de expresión de Foxp3⁺ en Tregs (Caretto et al., 2010; Kastner et al., 2010; Koenen et al., 2008). Para sortear estos desafíos, los ratones NOD se trataron comenzando a una edad más temprana (4 semanas de edad) antes de la inducción manifiesta de células T autorreactivas e insulinitis. También se incluyó CTLA-4Ig como un control positivo en este estudio, ya que Bluestone y colegas (Lenschow et al., 1995) habían demostrado un beneficio usando este agente en este modelo; se usó mIgG2a como un control negativo adicional a la disolución salina. En contraste con los resultados en ratones más viejos (Fig. 10A), el número de Tregs Foxp3⁺ en la sangre periférica de ratones NOD más jóvenes tratados durante 2 semanas con BsB no aumentó con respecto a los que se les administró disolución salina o mIgG (Fig. 11A). Sin estar atados a una teoría particular, esto podría ser debido a que el número de células T auto-reactivas en los ratones NOD de 4 semanas de edad (en contraste con los ratones de 9-12 semanas de edad usados en el estudio anterior) fue muy bajo. El número de Tregs específicas de antígeno inducidas fue probablemente demasiado pequeño para registrarlas por encima de los niveles basales presentes en los animales. Se observó una incidencia significativamente menor de DT1

en ratones NOD administrados con BsB cuando se compara con los controles tratados con disolución salina antes de las 24 semanas de edad (Fig. 11B). Sin embargo, este beneficio se redujo en los puntos temporales más tardíos.

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

Ejemplo 11

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

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

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

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

La reticulación de CTLA-4 y TCR por medio de MHCII usando una nueva proteína de fusión biespecífica (BsB) indujo de forma eficaz la producción de Tregs específicas de antígeno, además de las citocinas anti-inflamatorias, IL-10 y TGF- β . Estudios anteriores mostraron que las Tregs son críticas para dar tolerancia inmunológica, y que las Tregs específicas de antígeno son más eficaces en los modelos animales de enfermedades autoinmunitarias. BsB se evaluó adicionalmente en modelos animales de enfermedades autoinmunitarias, tal como DT1. Sin estar atados a una teoría particular, se hipotetizó que si BsB promovía la inducción de Tregs específicas de antígeno durante la fase temprana

de activación de células T autorreactivas en ratones NOD, podía retrasar el comienzo o detener la progresión de la enfermedad convirtiendo las células T autorreactivas que están experimentando activación a Tregs.

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

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

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

La terapia celular que usa Tregs recién aisladas, expandidas *ex vivo* o inducidas *in vitro* en modelos animales de enfermedades autoinmunitarias o trasplantes de órganos ha demostrado que la transferencia adoptiva de Tregs puede restaurar el equilibrio de Tregs frente a células T efectoras, controlando así la exuberante autoinmunidad asociada

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

Los resultados presentados aquí se obtuvieron usando los siguientes métodos y materiales, a menos que se indique de otro modo.

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

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

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

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

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

Ensayo de inducción de Tregs específicas de antígeno. Los ensayos en un marco de MLR alogénica se realizaron como se presenta anteriormente (Karman et al., 2012). Para la activación de células T específicas de antígeno, se mezclaron 10⁵ células T OT-II no tratadas anteriormente en placas de 96 pocillos de fondo redondo con 10⁵ APCs singénicas irradiadas, en presencia de Ova₃₂₃₋₃₂₉ a 0,5 μ g/ml y 1 μ g/ml de anticuerpo soluble anti-CD28 (clon 37.51, eBioscience). Los constructos de ensayo, IgG2a de ratón, o CTLA-4Ig de ratón, se añadieron a las células cultivadas a una concentración de saturación de 100 μ g/ml. Las células se cultivaron durante 5 días para inducir la producción de Tregs, y se analizaron por citometría de flujo. Los medios se recogieron para el análisis de IL-2, IL-10 y TGF- β usando kits ELISA según las instrucciones del fabricante. Para evaluar la proliferación de células T, células T OT-II no tratadas anteriormente purificadas se marcaron con 5 μ M de CFSE durante 5 min a 37°C. Después se lavaron para eliminar el CFSE no unido, y se usaron en ensayos de inducción de Tregs como se describe anteriormente. Las células

se cultivaron durante 5 días para permitirles dividirse antes de analizarlas por citometría de flujo. Para detectar Foxp3⁺ en las células T, las células se tiñeron para marcadores de superficie como se describe anteriormente, seguido de la permeabilización con amortiguador Fix/Perm (eBioscience) y tinción con anticuerpo anti-Foxp3 conjugado con PE-Cy7 (clon FJK-16s, eBioscience).

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

Tratamiento de ratones NOD con BsB. En el tratamiento corto, se trataron ratones NOD hembras de 4 semanas de edad con disolución salina, 20 mg/kg de BsB, 20 mg/kg de IgG2a de ratón, o 10 mg/kg de CTLA-4lg humano (Orencia) tres veces a la semana por inyección intraperitoneal durante un periodo de 2,5 semanas. Para el modelo de prevención tardía, se trataron ratones NOD de 9-12 semanas de edad con disolución salina o 20 mg/kg de BsB como anteriormente durante 4 semanas. Para el tratamiento más largo, se trataron ratones NOD con BsB o disolución salina como anteriormente durante 10 semanas desde una edad de 4 semanas a 13 semanas. Se monitorizaron semanalmente los niveles de glucosa en sangre no en ayunas, comenzando a las 8 semanas de edad. Los ratones se consideraron diabéticos cuando sus lecturas de glucosa fueron mayores de 300 mg/dl durante tres lecturas consecutivas. Las Tregs Foxp3⁺ en sangre periférica se examinaron después de dos semanas de tratamiento por citometría de flujo. Brevemente, 50 μ l de sangre completa se bloqueó con anti-Fc γ R1Ib y Fc γ R1II (clon 93, eBioscience) sin marcar durante 20 min. Las células se tiñeron posteriormente durante 30 min con el anticuerpo anti-CD4 marcado de forma fluorescente, y después se lavaron. Los glóbulos rojos se lisaron usando disolución FACS Lysing solution (BD Biosciences) durante 5 min. Después del lavado, las células se fijaron, se permeabilizaron, y se tiñeron con un anticuerpo anti-Foxp3 marcado con FITC durante 30 min como se describe anteriormente. Los páncreas se diseccionaron a la mitad, con una mitad fija en formalina en amortiguador neutro y la otra colocada en compuesto OCT, y después se congelaron en hielo seco.

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

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

Secuencias

50 Leyenda

CD80w88a = ligando de CTLA-4

IgG2a = región Fc de IgG2

G9 = Gly 9

Lag-3 = ligando de MHC

55 H6 = His 6

SEQ ID NO. 1:

ES 2 810 424 T3

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

Secuencia nucleotídica del constructo sustituto de ratón (Gen1):

```
ATGGCTTGCAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTC
CAAGGCTCATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTCGTCTTTCACAAGTGTCTTCAGA
TGTTGATGAACAACGTCCAAGTCAGTGAAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCG
TTACAACCTCTCCTCATGAAGATGAGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACAT
GACAAAGTGGTGCTGTCTGTCATTGCTGGGAAACTAAAAGTGGCGCCCGAGTAT
AAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTCTTATCATCCTGGGCCTGG
TCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCGTFCAAAAGAAGGAAAGAGGAA
CGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAGCTGACTTCTC
TACCCCAACATAACTGAGTCTGGAAACCCATCTGCAGACACTAAAAGGATTAC
CTGCTTTGCTFCCGGGGGITTCCCAAAGCCTCGCTTCTCTTGGTTGGAAAATGG
AAGAGAATTACCTGGCATCAATACGACAATTTCCAGGATCCTGAATCTGAATTG
TACACCATTAGTAGCCAACACTAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGT
GTCTCATFAAATATGGAGATGCTCACGTGTCAGAGGACTTCACCTGGGAGCCCA
GAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCT
TGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTAATCATGA
TCTCCCTGAGCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGAC
CCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTCGTGAACAACGTGGAAGTACTCACAGCTCAG
ACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTC
CCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAA
CAACAAAGCCCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGT
CAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTA
AGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTT
ACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAA
```

CCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCCTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAA
AAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGCTCAGTGGTCCACGAGGG
TCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAAGGCG
GTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTGGGCCTGGGAAAGAGCTCCCGTGGTGT
GGGCCAGGAGGGAGCTCCCGTCCATCTTCCCTGCAGCCTCAAATCCCCAAC
CTGGATCCTAACTTTCTACGAAGAGGAGGGGTTATCTGGCAACATCAACCAGAC
AGTGGCCAACCCACTCCCATCCCGGCCCTTGACCTTACCAGGGGATGCCCTC
GCCTAGACAACCCGCACCCGGTCGCTACACGGTGCTGAGCGTGGCTCCAGGA
GGCCTGCGCAGCGGGAGGCAGCCCTGCATCCCCACGTGCAGCTGGAGGAGC
GCGGCCTCCAGCGCGGGGACTTCTCTGTGGTTGCGCCAGCTCTGCGCAC
CGATGCGGGCGAGTACCACGCCACCGTGCGCCTCCCGAACCGCGCCCTCTCC
TGCAGTCTCCGCTGCGCGTCGGCCAGGCCTCGATGATTGCTAGTCCCTCAGG
AGTCCTCAAGCTGTCTGATTGGGTCCTTTTGAACTGCTCCTTACGCCGTCTGA
CCGCCAGTCTCTGTGCACTGGTTCAGGGCCAGAACCGAGTGCCTGTCTACA
ACTCACCGCGTCATTTTTAGCTGAACTTTCCTGTTACTGCCCAAGTCAGCCC
CCTGGACTCTGGGACCTGGGGCTGTGTCTCACCTACAGAGATGGCTTCAATG
TCTCCATCACGTACAACCTCAAGGTTCTGGGTCTGGAGCCCGTAGCCCACCATC
ACCATCATCACTGA

SEQ ID NO. 2:

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

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

MACNCQLMQDTPLLKFPCLLILFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYN
SPHEDESEDRIYWQKHDKVLSVIAGKLVKVAPEYKNRTLYDNTTYSLILGLVLSDRG
TYSVQKKEKRGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPK
PRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSED
FTWEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLISPMVTCVVVDVSE
DDPDVQISWVFNNEVLTAAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV
NNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE
WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN
HHTTKSFSRTPGKGGGGGGGGGGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCSLKSPNLDPNF
LRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGGLRSGR
QPLHPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCSLRLRVGQ
ASMIASPSGVLKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGNRVPVYNSPRHFLAETF
LLLQVSPLDSTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAHHHHHH

5

SEQ ID NO. 3:

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

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

ATGGCTTGCAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTC
 CAAGGCTCATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTTCGTCTTTCACAAGTGTCTTCAGA
 TGGTTGATGAACAACGTCCAAGTCAGTCAAAGATAAAGGTATTGCTGCCTTGCCG
 TTACAACCTCCTCATGAAGATGAGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACAT
 GACAAAGTGGTGTCTGTCTGTCATTGCTGGGAACTAAAAGTGGCGCCCGAGTAT
 AAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTCTTATCATCCTGGGCCTGG
 TCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCGTTCAAAGAAGGAAAGAGGAA
 CGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAGCTGACTTCTC
 TACCCCAACATAACTGAGTCTGGAACCCATCTGCAGACACTAAAAGGATTAC
 CTGCTTTGCTTCCGGGGTTTCCCAAAGCCTCGCTTCTTGGTTGGAAAATGG
 AAGAGAATTACCTGGCATCAATACGACAATTTCCAGGATCCTGAATCTGAATTG
 TACACCATTAGTAGCCAACTAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGT
 GTCTCATTAAATATGGAGATGCTCACGTGTCAGAGGACTTACCTGGGGCGGTG
 GCGGCGGAGGCGGTGGCGGTGGGCCTGGGAAAGAGCTCCCCGTGGTGTGGG
 CCCAGGAGGGAGCTCCCGTCCATCTTCCCTGCAGCCTCAAATCCCCAACCTG
 GATCCTAACTTTCTACGAAGAGGAGGGTTATCTGGCAACATCAACCAGACAGT
 GGCAACCCACTCCCATCCCGGCCCTTGACCTTACCAGGGGATGCCCTCGCC
 TAGACAACCCGCACCCGGTTCGCTACACGGTGCTGAGCGTGGCTCCAGGAGGC
 CTGCGCAGCGGGAGGCAGCCCTGCATCCCCACGTGCAGCTGGAGGAGCGCG
 GCCTCCAGCGCGGGGACTTCTCTGTGGTTGCGCCAGCTCTGCGCACCGAT
 GCGGGCGAGTACCACGCCACCGTGCGCCTCCCGAACCGCGCCCTCTCCTGCA
 GTCTCCGCCTGCGCGTCCGCCAGGCCTCGATGATTGCTAGTCCCTCAGGAGTC
 CTCAAGCTGTCTGATTGGGTCCTTTTGAAGTCTCCTTCAGCCGTCTGACCGC
 CCAGTCTCTGTGCACTGGTTCCAGGGCCAGAACCGAGTGCCTGTCTACAACCTC
 ACCGCGTCATTTTTAGCTGAAACTTTCTGTACTGCCCAAGTCAGCCCCCT
 GGACTCTGGGACCTGGGGCTGTGTCTCACCTACAGAGATGGCTTCAATGTCT
 CCATCACGTACAACCTCAAGGTTCTGGGTCTGGAGCCCGTAGCCCCAGAGGG
 CCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGT
 GGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTAATCATGATCTCC
 CTGAGCCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGA
 TGTCCAGATCAGCTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTACTCACAGCTCAGACACA
 AACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAAGTGCCTCCCCAT
 CCAGCACCCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACA
 AAGCCCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTA
 AGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAA
 CAGGTCACTCTGACCTGCATGGTACAGACTTTCATGCCTGAAGACATTTACGTG
 GAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGT
 CCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAA
 GAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGCTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGC
 ACAATCACACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAATGA

SEQ ID NO. 4:

ES 2 810 424 T3

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

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

MACNCQLMQDTPLLKFPCLILLFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYN
SPHEDESEDRIYWQKHDKVVLVSVIAGKLVKVAPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRG
TYSCVVQKKERGTYEKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPK
PRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSED
FTWGGGGGGGGGGGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCSLKSPNLDPNFLRRGGVIWQ
HQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGGLRSGRQPLHPHVQLE
ERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCSLRLRVGQASMIASPSGVL
KLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNSPRHFLAETFLLLQVSP LDS
GTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAPRGPTIKCPPCKCPAPNLLGGPSVFI
FPPKIKDVLMISSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVLTAQTQTHREDYNST
LRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEE
EMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS DSGSYFMYSKLR
VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO. 5:

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

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAA
TTTCTTTCAGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTCTCACTTCTGTT CAGGTGTTATC
CACGTGACCAAGGAAGTCAAAGAAGTGGCAACGCTGTCTGTGGTCACAATGT
TTCTGTTGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAGGAGAAGAAAAT
GGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATATGGCCCGAGTACAAGAACC

ES 2 810 424 T3

GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAAAAGACGCTTT
CAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTAC
ACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCTAATATTAGAAGGATAATTTGCT
CAACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAG
AATTAATGCCATCAACACAACAGTTTTCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGC
TGTTAGCAGCAAACCTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTC
ATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGC
GGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGG
GCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCC
AGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACCTGGCAGCATCAGCCAGAC
AGTGGCCCCGCCGCTGCCGCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACC
CGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCCGCCGCTACACGGTGTGAG
CGTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGT
CCAGCTGGATGAGCGCGGCCGGCAGCGCGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGC
CCAGCCCGGCGCGCGGACGCCGGCAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGG
GACCGCGCCCTCCTCCTGCCGCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGA
CTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCAATTTGAACTGCT
CCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGGC
CAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCCTTAGCGGAAAGCTT
CCTCTTCTGCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCC
TCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGG
GTCTGCTGGTGCCCCGGGGCTCCGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
TGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTT
CCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCC
CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACC
TGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCCTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTATACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

SEQ ID NO. 6:

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

ES 2 810 424 T3

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV
EELAQTRIWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHL
SWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF
NWNTTGGGGGGGGGGSGAEVPWWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQ
HQPDSPGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGP RP RRYTVLSVGPGLRSGRLPLQP
RVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMT
ASPPGSLRASDVVILNCSFSRDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFL
FLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 7:

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

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAA
TTTCTTTT CAGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTT CAGGTGTTATC
CACGTGACCAAGGAAGT GAAAGAAGTGGCAACGCTGTCTGTGGT CACAATGT
TTCTGTTGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAGGAGAAGAAAAT
GGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATAGCCCCGAGTACAAGAACC
GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAAAGACGCTTT
CAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTAC
ACCTAGTATATCTGACTTTGAAATCCAACCTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCT
CAACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAG
AATTAATGCCATCAACACAACAGTTGCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGC
TGTTAGCAGCAAACCTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTC
ATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGC
GGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGG

5

ES 2 810 424 T3

GCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCC
AGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGAC
AGTGGCCCCGCGCTGCCGCCCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACC
CGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCGAGCGCTACACGGTGCTGAG
CGTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGT
CCAGCTGGATGAGCGCGGCCGCGAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGC
CCAGCCCCGGCGCGCGGACGCCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGG
GACCGCGCCCTCTCCTGCCGCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGA
CTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCATTTGAACTGCT
CCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGGC
CAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCACTTAGCGGAAAGCTT
CCTCTCCTGCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCC
TCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGG
GTCTGCTGGTGGCCCCGGGGCTCCGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
AGCCACCGAGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCCTCTT
CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCCCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC
CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACCG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

SEQ ID NO. 8:

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

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV
EELAQTRIWQKEKKMVLTMMSGDMNIAPEYKNRTIFDITNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHL
SWLENGEELNAINTTVAQDPETELYAVSSKLDNFMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF

5

ES 2 810 424 T3

NWNTTGGGGGGGGGGSGAEVPPVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTW
QHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPERYTVLSVGPGLRSGRLPLQ
PRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM
TASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVVPRESHHHLAESFL
FLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPPS
PAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 9:

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

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAA
TTTCTTTT CAGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTT CAGGTGTTATC
CACGTGACCAAGGAAGTGAAGAAGTGGCAACGCTGTCTGTGGTCACAATGT
TTCTGTTGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAAGGAGAAGAAAAT
GGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATAGCCCCGAGTACAAGAACC
GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTICTGAAGTATGAAAAAGACGCTTTT
AAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTACA
CCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCAACTTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCTC
AACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAGA
ATTAAATGCCATCAACACAACAGTTGCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGCT
GTTGCCAGCAAACCTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTCA
TCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGCG
GTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGGG
CCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCCA
GGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGACA
GTGGCCCGCCCGCTGCCGCCCGCGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACCC
GGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCCGAGCGCTACACGGTGCTGAGC
GTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGTC
CAGCTGGATGAGCGCGGCCGCGCAGCGCGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGCC
CAGCCCCGCGCGCGGACGCGCGGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGGG
ACCGCGCCCTCCTCCTGCCGCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGACT

5

ES 2 810 424 T3

GCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCATTTTGAAGTCTC
CTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGGCC
AGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCCTTAGCGGAAAGCTTC
CTCTTCCTGCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCCT
CACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGGG
TCTGCTGGTGCCCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAA
GCCCACCGAGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCCTCAGTCTTCCTCTTC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA
CCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
CACCTGCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCT
GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

SEQ ID NO. 10:

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

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKVKEVATLSCGHNVSV
EELAQTRIWQKEKKMVLTMMSGDMNIAPEYKNRTIFDITNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHL
SWLENGEELNAINTTVAQDPETELYAVASKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF
NWNTTGGGGGGGGGGSGAEVPVWVAQEGAPAQLPCSPPTIPLQDLSLLRRAGVTW
QHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPERYTVLSVGPGLRSGRLPLQ
PRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM
TASPPGSLRASDWVILNCSFSRDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPIHHLAESFL
FLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPCKDKTHTSPPS
PAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5

SEQ ID NO. 11:

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

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAA
 TTTCTTTTCTCAGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTTCAAGGTGTTATC
 CACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGT
 TTCTGTTGAAGAGCTGGCACAACCTCGCATCTACTGGCAAAAGGAGAAGAAAAT
 GGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATATGGCCCGAGTACAAGAACC
 GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
 ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAAAAGACGCTTT
 CAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTAC
 ACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCACACTTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCT
 CAACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAG
 AATTAATGCCATCAACACAACAGTTGCCCAAGATCCTGAAACTGCCCTCTATGC
 TGTTAGCAGCAAACTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTC
 ATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGC
 GGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGG
 GCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCC
 AGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGAC
 AGTGGCCCCGCGCTGCCGCCCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACC
 CGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCGAGCGCTACACGGTGTCTGAG
 CGTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGT
 CCAGCTGGATGAGCGCGGCCGCGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGC
 CCAGCCCGGCGCGCGGACGCCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGG
 GACCGCGCCCTCTCCTGCCGCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGA
 CTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCAATTTGAACTGCT
 CCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGGC
 CAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCACTTAGCGGAAAGCTT
 CCTCTTCTGCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCC
 TCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGG
 GTCTGCTGGTGGCCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
 AGCCACCGAGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCTCTT
 CCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAT
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
 GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
 ACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGG
 CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCC
 CATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
 ACACCCTGCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACC
 TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
 TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACG
 GCTCCTTCTTCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
 GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

ES 2 810 424 T3

SEQ ID NO. 12:

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

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVS
EELAQTRIWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHL
SWLENGEELNAINTTVAQDPETALYAVSSKLDNFMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF
NWNTTGGGGGGGGGGSGAEVPVWVAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTW
QHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPERYTVLSVGPGLRSGRLPLQ
PRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM
TASPPGSLRASDVVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHLAESF
LFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPP
SPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 SEQ ID NO. 13:

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

ES 2 810 424 T3

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAA
TTTCTTTTCTCAGCTCTTGGTGTCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTTCTCAGGTGTTATC
CACGTGACCAAGGAAGTGAAGAAGTGGCAACGCTGTCCCTGTGGTCCACAATGT
TTCTGYFGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAGGAGAAGAAAAT
GGTGTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATATGGCCCGAGTACAAGAACC
GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAAAAGACGCTTT
CAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTAC
ACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCAACTTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCT
CAACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAG
AATTAATGCCATCAACACAACAGTTGCCCAAGATCCTGAAACTGCCCTCTATGC
TGTTGCCAGCAAACCTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTC
ATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGC
GGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGG
GCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCC
AGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGAC
AGTGGCCCCGCCGCTGCCGCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACC
CGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCCGAGCGCTACACGGTGTGAG
CGTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGT
CCAGCTGGATGAGCGCGGCCGGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGC
CCAGCCCCGGCGCGCGGACGCCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGG
GACCGCGCCCTCCTGCCGCCTCCGTCTGCGCCTGGGGCCAGGCCTCGATGA
CTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCATTTTGAAGTGT
CCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGGC
CAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCACTTAGCGGAAAGCTT
CCTCTCCTGCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCC
TCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGG
GTCTGCTGGTGCCCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
AGCCCACCGAGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGATCCTCAGTCTTCTCTT
CCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC
CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCCTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA

SEQ ID NO. 14:

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

ES 2 810 424 T3

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKVKEVATLSCGHNVS
EELAQTRIWQKEKMMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHL
SWLENGEELNAINTTVAQDPETALYAVASKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF
NWNTTGGGGGGGGGGSGAEVPPVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTIN
QHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPERYTVLSVGPGLRSGRLPLQ
PRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM
TASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPIHHHLAESFL
FLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPPS
PAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 15

CD80 humano

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFF QLLVLAGLSH FCSGVIHVTK EVKEVATLSC
GHNVSVEELA QTRIWQKEK KMLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNLS
IVILALRPSD EGYECVVLK YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF
EIPSTNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE ELNAINTTVS QDPETELYAV
SSKLDNFMTT NHSFMCLIKY GHLRVNQTFN WNTTKQEHFP DNLLPSWAIT
LISVNGIFVI CCLTYCFAPR CRERRRNERL RRESVRPV

5 SEQ ID NO. 16

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

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

ES 2 810 424 T3

ATGGCTTGCAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTC
CAAGGCTCATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTTCGTCTTTCACAAGTGTCTTCAGA
TGTTGATGAACAACGTCCAAGTCAGTCAAAGATAAAGGTATTGCTGCCTTGCCG
TTACAACCTCCTCATGAAGATGAGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACAT
GACAAAGTGGTGTCTGTCTGTCATTGCTGGGAAACTAAAAGTGGCGCCCGAGTAT
AAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTCTTATCATCCTGGGCCTGG
TCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCGTTCAAAGAAGGAAAGAGGAA
CGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAGCTGACTTCTC
TACCCCAACATAACTGAGTCTGGAACCCATCTGCAGACACTAAAAGGATTAC
CTGCTTTGCTTCCGGGGTTTCCCAAAGCCTCGCTTCTTGGTTGGAAAATGG
AAGAGAATTACCTGGCATCAATACGACAATTTCCAGGATCCTGAATCTGAATTG
TACACCATTAGTAGCCAACACTAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGT
GTCTCATTAATATGGAGATGCTCACGTGTCAGAGGACTTACCTGGGAGCCCA
GAGGGCCCAACATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCT
TGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTAATCATGA
TCTCCCTGAGCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGAC
CCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTACTCACAGCTCAG
ACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGTGGTCACTGCCCTC
CCCATCCAGCACCAAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAA
CAACAAAGCCCTCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGT
CAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTA
AGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTT
ACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAA
CCAGTCCCTGGACTCTGATGGTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAA
AAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGCTCAGTGGTCCACGAGGG
TCTGCACAATCACACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAAGGCG
GTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTGGGCCTGGGAAAGAGCTGGGTCTGGAGC
CCGTAGCCACCATCACCATCATCACTGA

SEQ ID NO. 17

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

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

5 MACNCQLMQDTPLLKFPCLRLLLVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYN
SPHEDESEDRIYWQKHDKVVLVSVIAGKLVKVAPEYKNRTLYDNTTYSLILGLVLSDRG
TYSCVVQKKERGTYEKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPK
PRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSED
FTWEPRGPTIKPCPPCKPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLISLSPMVTCVVVDVSE
DDPDVQISWVFNNEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV
NNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE
WTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN
HHTTKSFSRTPGKGGGGGGGGGGPGKELGLEPVAHHHHHH

Referencias

En la presente memoria se citan los siguientes documentos.

- Allan, S.E., R. Broady, S. Gregori, M.E. Himmel, N. Locke, M.G. Roncarolo, R. Bacchetta, y M.K. Levings. 2008. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev* 223:391-421.
- 5 Anderson, B.E., J.M. McNiff, C. Matte, I. Athanasiadis, W.D. Shlomchik, y M.J. Shlomchik. 2004. Recipient CD4+ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease. *Blood* 104:1565-1573.
- Anderson, M.S., y J.A. Bluestone. 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23:447-485.
- 10 Barnden, M.J., J. Allison, W.R. Heath, y F.R. Carbone. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76:34-40.
- Baroja, M.L., L. Vijaykrishnan, E. Bettelli, P.J. Darlington, T.A. Chau, V. Ling, M. Collins, B.M. Carreno, J. Madrenas, y V.K. Kuchroo. 2002. Inhibition of CTLA-4 function by the regulatory subunit of serine/threonine phosphatase 2A. *J Immunol* 168:5070-5078.
- 15 Bettini, M., A.L. Szymczak-Workman, K. Forbes, A.H. Castellaw, M. Selby, X. Pan, C.G. Drake, A.J. Korman, y D.A. Vignali. 2011. Cutting edge: accelerated autoimmune diabetes in the absence of LAG-3. *J Immunol* 187:3493-3498.
- Blair, P.J., J.L. Riley, B.L. Levine, K.P. Lee, N. Craighead, T. Francomano, S.J. Perfetto, G.S. Gray, B.M. Carreno, y C.H. June. 1998. CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J Immunol* 160:12-15.
- 20 Bluestone, J.A., C.R. Mackay, J.J. O'Shea, y B. Stockinger. 2009. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 9:811-816.
- Caretto, D., S.D. Katzman, A.V. Villarino, E. Gallo, y A.K. Abbas. 2010. Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells. *J Immunol* 184:30-34.
- 25 Chatenoud, L., E. Thervet, J. Primo, y J.F. Bach. 1994. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:123-127.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, y S.M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886.
- 30 Chuang, E., T.S. Fisher, R.W. Morgan, M.D. Robbins, J.M. Duerr, M.G. Vander Heiden, J.P. Gardner, J.E. Hambor, M.J. Neveu, y C.B. Thompson. 2000. The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity* 13:313-322.
- Daniel, C., B. Weigmann, R. Bronson, y H. von Boehmer. 2011. Prevention of type 1 diabetes in mice by tolerogenic vaccination with a strong agonist insulin mimetope. *J Exp Med* 208:1501-1510.
- 35 Fife, B.T., M.D. Griffin, A.K. Abbas, R.M. Locksley, y J.A. Bluestone. 2006. Inhibition of T cell activation and autoimmune diabetes using a B cell surface-linked CTLA-4 agonist. *J Clin Invest* 116:2252-2261.
- Gonzalez-Rey, E., A. Fernandez-Martin, A. Chorny, y M. Delgado. 2006. Vasoactive intestinal peptide induces CD4+, CD25+ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 54:864-876.
- 40 Griffin, M.D., D.K. Hong, P.O. Holman, K.M. Lee, M.J. Whitters, S.M. O'Herrin, F. Fallarino, M. Collins, D.M. Segal, T.F. Gajewski, D.M. Kranz, y J.A. Bluestone. 2000. Blockade of T cell activation using a surface-linked single-chain antibody to CTLA-4 (CD152). *J Immunol* 164:4433-4442.
- Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M.L. Belladonna, R. Bianchi, M.C. Fioretti, y P. Puccetti. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3:1097-1101.
- 45 Guntermann, C., y D.R. Alexander. 2002. CTLA-4 suppresses proximal TCR signaling in resting human CD4(+) T cells by inhibiting ZAP-70 Tyr(319) phosphorylation: a potential role for tyrosine phosphatases. *J Immunol* 168:4420-4429.
- Ise, W., M. Kohyama, K.M. Nutsch, H.M. Lee, A. Suri, E.R. Unanue, T.L. Murphy, y K.M. Murphy. 2010. CTLA-4 suppresses the pathogenicity of self antigen-specific T cells by cell-intrinsic and cell-extrinsic mechanisms. *Nat Immunol* 11:129-135.

- Jain, N., H. Nguyen, C. Chambers, y J. Kang. 2010. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1524-1528.
- Jiang, S., R.I. Lechler, y G. Lombardi. 2006. CD4+CD25+ regulatory T-cell therapy. *Expert review of clinical immunology* 2:387-392.
- 5 Karandikar, N.J., C.L. Vanderlugt, T.L. Walunas, S.D. Miller, y J.A. Bluestone. 1996. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* 184:783-788.
- Karman, J., J.L. Jiang, N. Gumlaw, H. Zhao, J. Campos-Rivera, J. Sancho, J. Zhang, C. Jiang, S.H. Cheng, y Y. Zhu. 2012. Ligation of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 to the TCR inhibits T cell activation and directs differentiation into FOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem*
- 10 Kastner, L., D. Dwyer, y F.X. Qin. 2010. Synergistic effect of IL-6 and IL-4 in driving fate revision of natural Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 185:5778-5786.
- Kehrl, J.H., L.M. Wakefield, A.B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M.B. Sporn, y A.S. Fauci. 1986. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 163:1037-1050.
- 15 Koenen, H.J., R.L. Smeets, P.M. Vink, E. van Rijssen, A.M. Boots, e I. Joosten. 2008. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112:2340-2352.
- Krummel, M.F., y J.P. Allison. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182:459-465.
- 20 Krummel, M.F., y J.P. Allison. 1996. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* 183:2533-2540.
- Lenschow, D.J., S.C. Ho, H. Sattar, L. Rhee, G. Gray, N. Nabavi, K.C. Herold, y J.A. Bluestone. 1995. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* 181:1145-1155.
- Linsley, P.S., y P. Golstein. 1996. Lymphocyte activation: T-cell regulation by CTLA-4. *Curr Biol* 6:398-400.
- 25 Linsley, P.S., J.L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J.A. Ledbetter, y R. Peach. 1994. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1:793-801.
- Marie, J.C., J.J. Letterio, M. Gavin, y A.Y. Rudensky. 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201: 1061-1067.
- 30 Masteller, E.L., M.R. Warner, Q. Tang, K.V. Tarbell, H. McDevitt, y J.A. Bluestone. 2005. Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from nonobese diabetic mice. *J Immunol* 175:3053-3059.
- McDevitt, H., S. Singer, y R. Tisch. 1996. The role of MHC class II genes in susceptibility and resistance to type I diabetes mellitus in the NOD mouse. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 28:287-288.
- 35 Murai, M., O. Turovskaya, G. Kim, R. Madan, C.L. Karp, H. Cheroutre, y M. Kronenberg. 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 10:1178-1184.
- Nishio, J., M. Feuerer, J. Wong, D. Mathis, y C. Benoist. 2010. Anti-CD3 therapy permits regulatory T cells to surmount T cell receptor-specified peripheral niche constraints. *J Exp Med* 207:1879-1889.
- 40 Ohata, J., T. Miura, T.A. Johnson, S. Hori, S.F. Ziegler, y H. Kohsaka. 2007. Enhanced efficacy of regulatory T cell transfer against increasing resistance, by elevated Foxp3 expression induced in arthritic murine hosts. *Arthritis Rheum* 56:2947-2956.
- Onodera, T., M.H. Jang, Z. Guo, M. Yamasaki, T. Hirata, Z. Bai, N.M. Tsuji, D. Nagakubo, O. Yoshie, S. Sakaguchi, O. Takikawa, y M. Miyasaka. 2009. Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions. *J Immunol* 183:5608-5614.
- 45 Paterson, A.M., and A.H. Sharpe. 2010. Taming tissue-specific T cells: CTLA-4 reins in self-reactive T cells. *Nat Immunol* 11:109-111.
- Pentcheva-Hoang, T., J.G. Egen, K. Wojnoonski, y J.P. Allison. 2004. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21:401-413.

- Pontow, S.E., V. Kery, y P.D. Stahl. 1992. Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 137B:221-244.
- Qu, H.Q., J.P. Bradfield, S.F. Grant, H. Hakonarson, and C. Polychronakos. 2009. Remapping the type I diabetes association of the CTLA4 locus. *Genes and immunity* 10 Suppl 1:527-32.
- 5 Riley, J.L., C.H. June, y B.R. Blazar. 2009. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity* 30:656-665.
- Roncarolo, M.G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, y M.K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28-50.
- Roopenian, D.C., y S. Akilesh. 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7:715-725.
- 10 Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, y M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
- Salomon, B., D.J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, y J.A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.
- 15 Shoda, L.K., D.L. Young, S. Ramanujan, C.C. Whiting, M.A. Atkinson, J.A. Bluestone, G.S. Eisenbarth, D. Mathis, A.A. Rossini, S.E. Campbell, R. Kahn, y H.T. Kruwel. 2005. A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity* 23:115-126.
- Simon, G., M. Parker, V. Ramiya, C. Wasserfall, Y. Huang, D. Bresson, R.F. Schwartz, M. Campbell-Thompson, L. Tenace, T. Brusko, S. Xue, A. Scaria, M. Lukason, S. Eisenbeis, J. Williams, M. Clare-Salzler, D. Schatz, B. Kaplan, M. Von Herrath, K. Womer, y M.A. Atkinson. 2008. Murine antithymocyte globulin therapy alters disease progression in NOD mice by a time-dependent induction of immunoregulation. *Diabetes* 57:405-414.
- 20 Steinman, R.M., D. Hawiger, y M.C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
- Tang, Q., J.A. Bluestone, y S.M. Kang. 2012. CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell therapy in transplantation. *Journal of molecular cell biology* 4:11-21.
- 25 Tang, Q., K.J. Henriksen, M. Bi, E.B. Finger, G. Szot, J. Ye, E.L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi, y J.A. Bluestone. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199:1455-1465.
- Tang, Q., K.J. Henriksen, E.K. Boden, A.J. Tooley, J. Ye, S.K. Subudhi, X.X. Zheng, T.B. Strom, y J.A. Bluestone. 30 2003. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 171:3348-3352.
- Tarbell, K.V., L. Petit, X. Zuo, P. Toy, X. Luo, A. Mqadmi, H. Yang, M. Suthanthiran, S. Mojsov, y R.M. Steinman. 2007. Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med* 204:191-201.
- 35 Taylor, P.A., C.J. Lees, y B.R. Blazar. 2002. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 99:3493-3499.
- Tivol, E.A., F. Borriello, A.N. Schweitzer, W.P. Lynch, J.A. Bluestone, y A.H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541-547.
- 40 Tsunawaki, S., M. Sporn, A. Ding, y C. Nathan. 1988. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 334:260-262.
- Ueda, H., J.M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D.B. Rainbow, K.M. Hunter, A.N. Smith, G. Di Genova, M.H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R.C. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H.E. Rance, V. Everett, L.J. Smink, A.C. Lam, H.J. Cordell, N.M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J.F. Hess, M.L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadi, R. Nithiyanathan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K.M. Gillespie, D.E. Undlien, K.S. Ronningen, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D.A. Savage, A.P. Maxwell, D.J. Carson, C.C. Patterson, J.A. Franklyn, D.G. Clayton, L.B. Peterson, L.S. Wicker, J.A. Todd, y S.C. Gough. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423:506-511.
- 45 Vergani, A., F. D'Addio, M. Jurewicz, A. Petrelli, T. Watanabe, K. Liu, K. Law, C. Schuetz, M. Carvello, E. Orsenigo, S. Deng, S.J. Rodig, J.M. Ansari, C. Staudacher, R. Abdi, J. Williams, J. Markmann, M. Atkinson, M.H. Sayegh, y
- 50

- P. Fiorina. 2010. A novel clinically relevant strategy to abrogate autoimmunity and regulate alloimmunity in NOD mice. *Diabetes* 59:2253-2264.
- Wahl, S.M., N. McCartney-Francis, J.B. Allen, E.B. Dougherty, y S.F. Dougherty. 1990. Macrophage production of TGF-beta and regulation by TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci* 593:188-196.
- 5 Walunas, T.L., C.Y. Bakker, y J.A. Bluestone. 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 183:2541-2550.
- Walunas, T.L., y J.A. Bluestone. 1998. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J Immunol* 160:3855-3860.
- 10 Walunas, T.L., D.J. Lenschow, C.Y. Bakker, P.S. Linsley, G.J. Freeman, J.M. Green, C.B. Thompson, y J.A. Bluestone. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405-413.
- Waterhouse, P., J.M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K.P. Lee, C.B. Thompson, H. Griesser, y T.W. Mak. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. *Science* 270:985-988.
- Weigel, P.H. 1994. Galactosyl and N-acetylgalactosaminyl homeostasis: a function for mammalian asialoglycoprotein receptors. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 16:519-524.
- 15 Wicker, L.S., J.A. Todd, y L.B. Peterson. 1995. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* 13:179-200.
- Yamagiwa, S., J.D. Gray, S. Hashimoto, y D.A. Horwitz. 2001. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 166:7282-7289.
- 20 Zhao, D., C. Zhang, T. Yi, C.L. Lin, I. Todorov, F. Kandeel, S. Forman, y D. Zeng. 2008. In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease. *Blood* 112:2129-2138.
- Zheng, S.G., J.D. Gray, K. Ohtsuka, S. Yamagiwa, y D.A. Horwitz. 2002. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol* 169:4183-4189.
- 25 Zhou, X., S. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, y J.A. Bluestone. 2009a. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr Opin Immunol* 21:281-285.
- Zhou, X., S.L. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martinez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, y J.A. Bluestone. 2009b. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* 10:1000-1007.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> GENZYME CORPORATION
- <120> INHIBIDORES DE LA ACTIVACIÓN DE CÉLULAS T
- <130> P41973EP-D1-PCT
- <140> No asignado aún
- < 141> 2012-06-29
- 35 <150> EP12804528.3
- < 151> 2012-06-29
- <150> US 61/503,282
- < 151> 2011-06-30
- <160> 17
- 40 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 2160
- <212> ADN

ES 2 810 424 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica de constructo sustituto de ratón (Gen1)

<400> 1

atggccttgca attgtcagtt gatgcaggat acaccactcc tcaagtttcc atgtccaagg	60
ctcattcttc tctttgtgct gctgattcgt ctttcacaag tgtcttcaga tgttgatgaa	120
caactgtcca agtcagtgaa agataaggta ttgctgcctt gccgttaca ctctcctcat	180
gaagatgagt ctgaagaccg aatctactgg caaaaacatg acaaagtggg gctgtctgtc	240
attgctggga aactaaaagt ggcgcccag tataagaacc ggactttata tgacaacact	300
acctactctc ttatcatcct ggcctcgtc ctttcagacc ggggcacata cagctgtgtc	360
gttcaaaaaga aggaaagagg aacgatgaa gttaaacact tggcttagt aaagttgtcc	420
atcaaagctg acttctctac cccaacata actgagtctg gaaaccatc tgcagacact	480
aaaaggatta cctgctttgc ttccgggggt ttcccaaagc ctcgcttctc ttggttgaa	540
aatggaagag aattacctgg catcaatag acaatttccc aggatcctga atctgaattg	600
tacaccatta gtagccaact agatttcaat acgactcga accacacat taagtgtctc	660
attaaatatg gagatgctca cgtgtcagag gacttcacct gggagcccag agggcccaca	720
atcaagccct gtcctccatg caaatgccca gcacctaacc tcttgggtgg accatccgtc	780
ttcatcttcc ctccaaagat caaggatgta ctcatgatct ccctgagccc catggtcaca	840
tgtgtggtgg tggatgtgag cgaggatgac ccagatgtcc agatcagctg gttcgtgaac	900
aacgtggaag tactcacagc tcagacacaa acccatagag aggattacaa cagtactctc	960
5 cgggtggtca gtgccctccc catccagcac caggactgga tgagtggcaa ggagttcaaa	1020

ES 2 810 424 T3

tgcaaggtca acaacaaagc cctcccagcg cccatcgaga gaaccatctc aaaacccaaa 1080
 gggtcagtaa gagctccaca ggtatatgtc ttgcctccac cagaagaaga gatgactaag 1140
 aaacaggtca ctctgacctg catggtcaca gacttcatgc ctgaagacat ttacgtggag 1200
 tggaccaaca acgggaaaac agagctaaac tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct 1260
 gatggttctt acttcatgta cagcaagctg agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga 1320
 aatagctact cctgctcagt ggtccacgag ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc 1380
 ttctcccgga ctccgggtaa aggcggtggc ggcggaggcg gtggcgggtg gcctgggaaa 1440
 gagctccccg tgggtgggg ccaggaggga gctcccgtcc atcttccctg cagcctcaaa 1500
 tcccccaacc tggatcctaa ctttctacga agaggagggg ttatctggca acatcaacca 1560
 gacagtggcc aacccactcc catcccggcc ctgaccttc accaggggat gccctcgct 1620
 agacaaccgg caccgggtcg ctacacggtg ctgagcgtgg ctccaggagg cctgcgcagc 1680
 gggaggcagc cctgcatcc ccacgtgcag ctggaggagc gcggcctcca gcgcggggac 1740
 ttctctctgt ggttgcgccc agctctgcgc accgatgcgg gcgagtacca cgccaccgtg 1800
 cgctcccga accgcgccct ctctgcagt ctccgcctgc gcgtcggcca ggcctcgatg 1860
 attgctagtc cctcaggagt cctcaagctg tctgattggg tccttttgaa ctgctccttc 1920
 agccgtcctg accgccagc ctctgtgcac tggttccagg gccagaaccg agtgcctgtc 1980
 tacaactcac cgcgtcattt tttagctgaa actttcctgt tactgcccc agtcagcccc 2040
 ctggactctg ggacctgggg ctgtgtcctc acctacagag atggcttcaa tgtctccatc 2100
 acgtacaacc tcaaggttct gggctctggag cccgtagccc accatcacca tcatcactga 2160

<210> 2

<211> 719

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica traducida de constructo sustituto de ratón (Gen1)

<400> 2

Met Ala Cys Asn Cys Gln Leu Met Gln Asp Thr Pro Leu Leu Lys Phe
 1 5 10 15

Pro Cys Pro Arg Leu Ile Leu Leu Phe Val Leu Leu Ile Arg Leu Ser
 20 25 30

Gln Val Ser Ser Asp Val Asp Glu Gln Leu Ser Lys Ser Val Lys Asp
 35 40 45

10

ES 2 810 424 T3

Lys Val Leu Leu Pro Cys Arg Tyr Asn Ser Pro His Glu Asp Glu Ser
 50 55 60

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 Ala Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu
 85 90 95

Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser
 100 105 110

Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr
 115 120 125

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
 145 150 155 160

Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe
 165 170 175

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

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 Pro Arg Gly Pro Thr
 225 230 235 240

Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
 275 280 285

Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
 290 295 300

ES 2 810 424 T3

Leu Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
 325 330 335

Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
 370 375 380

Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu
 385 390 395 400

Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
 420 425 430

Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val
 435 440 445

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr
 450 455 460

Pro Gly Lys Gly Pro Gly Lys
 465 470 475 480

Glu Leu Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Val His Leu Pro
 485 490 495

Cys Ser Leu Lys Ser Pro Asn Leu Asp Pro Asn Phe Leu Arg Arg Gly
 500 505 510

Gly Val Ile Trp Gln His Gln Pro Asp Ser Gly Gln Pro Thr Pro Ile
 515 520 525

Pro Ala Leu Asp Leu His Gln Gly Met Pro Ser Pro Arg Gln Pro Ala
 530 535 540

Pro Gly Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Ala Pro Gly Gly Leu Arg Ser
 545 550 555 560

ES 2 810 424 T3

Gly Arg Gln Pro Leu His Pro His Val Gln Leu Glu Glu Arg Gly Leu
565 570 575

Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Leu Arg Thr Asp
580 585 590

Ala Gly Glu Tyr His Ala Thr Val Arg Leu Pro Asn Arg Ala Leu Ser
595 600 605

Cys Ser Leu Arg Leu Arg Val Gly Gln Ala Ser Met Ile Ala Ser Pro
610 615 620

Ser Gly Val Leu Lys Leu Ser Asp Trp Val Leu Leu Asn Cys Ser Phe
625 630 635 640

Ser Arg Pro Asp Arg Pro Val Ser Val His Trp Phe Gln Gly Gln Asn
645 650 655

Arg Val Pro Val Tyr Asn Ser Pro Arg His Phe Leu Ala Glu Thr Phe
660 665 670

Leu Leu Leu Pro Gln Val Ser Pro Leu Asp Ser Gly Thr Trp Gly Cys
675 680 685

Val Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Thr Tyr Asn Leu
690 695 700

Lys Val Leu Gly Leu Glu Pro Val Ala His His His His His His
705 710 715

<210> 3

<211> 2139

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica de constructo sustituto de ratón (Gen 2)

<400> 3

atggccttgca attgtcagtt gatgcaggat acaccactcc tcaagtttcc atgtccaagg	60
ctcattcttc tctttgtgct gctgattcgt ctttcacaag tgtcttcaga tgttgatgaa	120
caactgtcca agtcagttaa agataagta ttgctgcctt gccgttataa ctctcctcat	180
gaagatgagt ctgaagaccg aatctactgg caaaaacatg acaaagtggt gctgtctgtc	240
attgctggga aactaaaagt ggcgcccagag tataagaacc ggactttata tgacaacact	300
acctactctc ttatcatcct gggcctggtc ctttcagacc ggggcacata cagctgtgtc	360

10

ES 2 810 424 T3

gttcaaaaga aggaaagagg aacgtatgaa gttaaact tggctttagt aaagttgtcc 420
atcaaagctg acttctctac ccccaacata actgagtctg gaaacccatc tgcagacact 480
aaaaggatta cctgctttgc ttccgggggt ttcccaaagc ctcgcttctc ttggttgaa 540
aatggaagag aattacctgg catcaatagc acaatttccc aggatcctga atctgaattg 600
tacaccatta gtagccaact agatttcaat acgactcgc accacacat taagtgtctc 660
attaaatatg gagatgctca cgtgtcagag gacttcacct ggggcggtgg cggcggaggc 720
ggtggcggtg ggcctgggaa agagctcccc gtggtgtggg cccaggaggg agctcccgtc 780
catcttcctc gcagcctcaa atcccccaac ctggatccta actttctacg aagaggaggg 840
gttatctggc aacatcaacc agacagtggc caaccacctc ccatcccgcc ccttgacctt 900
caccagggga tgcctcgcg tagacaacct gcacccggtc gctacacggt gctgagcgtg 960
gctccaggag gcctgcgcag cgggaggcag cccctgcac cccacgtgca gctggaggag 1020
cgcggcctcc agcgcgggga cttctctctg tggttgcgcc cagctctgcg caccgatgcg 1080
ggcgagtacc acgccaccgt gcgcctccc aaccgcgcc tctcctgcag tctccgctg 1140
cgcgtcggcc aggcctcgat gattgctagt ccctcaggag tcctcaagct gtctgattgg 1200
gtccttttga actgctcctt cagccgtcct gaccgccag tctctgtgca ctggttccag 1260
ggcagaacc gagtgctgt ctacaactca ccgcgtcatt ttttagctga aactttcctg 1320
ttactgcccc aagtcagccc cctggactct gggacctggg gctgtgtcct cacctacaga 1380
gatggcttca atgtctccat cacgtacaac ctcaaggtc tgggtctgga gcccgtagcc 1440
cccagagggc ccacaatcaa gccctgtcct coatgcaaat gcccagcacc taacctctg 1500
ggtggaccat ccgtcttcat cttccctcca aagatcaagg atgtactcat gatctccctg 1560
agcccatgg tcacatgtgt ggtggtggat gtgagcgagg atgaccaga tgtccagatc 1620
agctggttcg tgaacaacgt ggaagtactc acagctcaga cacaaccaca tagagaggat 1680
tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt 1740
ggcaaggagt tcaaatgcaa ggtcaacaac aaagccctcc cagcgcctat cgagagaacc 1800
atctcaaac ccaaagggtc agtaagagct ccacaggtat atgtcttgcc tccaccagaa 1860
gaagagatga ctaagaaca ggtcactctg acctgcatgg tcacagactt catgcctgaa 1920
gacatttacg tggagtggac caacaacggg aaaacagagc taaactacaa gaacactgaa 1980
ccagtcctgg actctgatgg ttcttacttc atgtacagca agctgagagt ggaaaagaag 2040
aactgggtgg aaagaaatag ctactcctgc tcagtgtcc acgagggtct gcacaatcac 2100
cacacgacta agagcttctc ccgactccg ggtaaatga 2139

<210> 4

<211> 712

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica traducida de constructo sustituto de ratón (Gen 2)

ES 2 810 424 T3

<400> 4

Met Ala Cys Asn Cys Gln Leu Met Gln Asp Thr Pro Leu Leu Lys Phe
1 5 10 15

Pro Cys Pro Arg Leu Ile Leu Leu Phe Val Leu Leu Ile Arg Leu Ser
20 25 30

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

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 Ala Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu
85 90 95

Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser
100 105 110

Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr
115 120 125

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
145 150 155 160

Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe
165 170 175

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

Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly
210 215 220

ES 2 810 424 T3

Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Pro Gly Lys Glu Leu Pro Val Val Trp Ala Gln Glu
 245 250 255
 Gly Ala Pro Val His Leu Pro Cys Ser Leu Lys Ser Pro Asn Leu Asp
 260 265 270
 Pro Asn Phe Leu Arg Arg Gly Gly Val Ile Trp Gln His Gln Pro Asp
 275 280 285
 Ser Gly Gln Pro Thr Pro Ile Pro Ala Leu Asp Leu His Gln Gly Met
 290 295 300
 Pro Ser Pro Arg Gln Pro Ala Pro Gly Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val
 305 310 315 320
 Ala Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Gln Pro Leu His Pro His Val
 325 330 335
 Gln Leu Glu Glu Arg Gly Leu Gln Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu
 340 345 350
 Arg Pro Ala Leu Arg Thr Asp Ala Gly Glu Tyr His Ala Thr Val Arg
 355 360 365
 Leu Pro Asn Arg Ala Leu Ser Cys Ser Leu Arg Leu Arg Val Gly Gln
 370 375 380
 Ala Ser Met Ile Ala Ser Pro Ser Gly Val Leu Lys Leu Ser Asp Trp
 385 390 395 400
 Val Leu Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro Val Ser Val
 405 410 415
 His Trp Phe Gln Gly Gln Asn Arg Val Pro Val Tyr Asn Ser Pro Arg
 420 425 430
 His Phe Leu Ala Glu Thr Phe Leu Leu Leu Pro Gln Val Ser Pro Leu
 435 440 445
 Asp Ser Gly Thr Trp Gly Cys Val Leu Thr Tyr Arg Asp Gly Phe Asn
 450 455 460
 Val Ser Ile Thr Tyr Asn Leu Lys Val Leu Gly Leu Glu Pro Val Ala

ES 2 810 424 T3

<400> 5

atgggccaca cacggaggca gggaaacatca ccatccaagt gtccatacct caatctcttt	60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag	120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca	180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac	240
atgaatatat ggcccagta caagaaccgg accatctttg atatcaactaa taacctctcc	300
attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag	360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct	420
gacttcctta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaataat tagaaggata	480
atgtgctcaa cctctggagg tttccagag cctcacctct cctggttga aaatggagaa	540
gaattaaatg ccatcaaac aacagtttcc caagatctg aactgagct ctatgctgtt	600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat	660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tgggaatacaa ccggcgggtg cgggggaggc	720
ggtggcgggt ccggagctga ggtcccgggt gtgtggggccc aggagggggc tcctgcccag	780
ctcccctgca gccccacaat ccccctccag gatctcagcc ttctgcgaag agcaggggtc	840
acttggcagc atcagccaga cagtggcccc cccgctgccg cccccggcca tcccctggcc	900
cccggccctc acccggcggc gcctcctcc tgggggccc ggccccgcc ctacacggtg	960
ctgagcgtgg gtcccggagg cctgcgcagc gggaggctgc ccctgcagcc ccgctccag	1020
ctggatgagc gcggccggca gcgcggggac ttctcgtat ggctgcgcc agcccggcgc	1080
gcggacgccg gcgagtaccg cgcgcgggtg cacctcaggg accgcgccct ctctgccgc	1140
ctcgtctgc gcctgggcca ggctcgtat actgccagcc ccccaggatc tctcagagcc	1200
tccgactggg tcattttgaa ctgctccttc agccgccctg accgcccagc ctctgtgcat	1260
tggtttcgga accggggcca gggcgcagtc cctgtccggg agtcccccca tcaccactta	1320
gcggaaagct tcctcttct gccccaagtc agccccatgg actctgggccc ctggggctgc	1380
atcctcacct acagagatgg cttcaacgtc tccatcatgt ataacctcac tgttctgggt	1440
ctgctggtgc cccggggctc cgagcccaaa tcttgtgaca aactcacac atgccaccg	1500
tgccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag	1560
gacaccctca tgatctccc gaccctgag gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac	1620

ES 2 810 424 T3

gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 1680
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 1740
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 1800
 ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1860
 tacaccctgc ccccatctcg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1920
 gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1980
 aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctatacagc 2040
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag cagggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 2100
 catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 2160

<210> 6

<211> 719

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica traducida de tipo salvaje de constructo humano de CTLA-4 BsB

<400> 6

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

10

ES 2 810 424 T3

Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala Ser
385 390 395 400

Asp Val Val Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro
405 410 415

Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val
420 425 430

Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro
435 440 445

Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr
450 455 460

Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly
465 470 475 480

Leu Leu Val Pro Arg Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
485 490 495

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
500 505 510

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
515 520 525

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
530 535 540

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
545 550 555 560

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
565 570 575

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
580 585 590

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
595 600 605

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
610 615 620

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
625 630 635 640

ES 2 810 424 T3

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
645 650 655

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
660 665 670

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
675 680 685

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
690 695 700

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715

<210> 7

<211> 2160

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica variante 1 de constructo humano de CTLA-4 BsB

<400> 7

atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt	60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag	120
gaagtгааag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca	180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac	240
atgaatatag cccccagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc	300
attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag	360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct	420
gacttccta cacctagtat atctgacttt gaaattcaa cttctaatat tagaaggata	480
at ttgctcaa cctctggagg ttttccagag cctcacctct cctggttggg aaatggagaa	540
gaattaaatg ccatcaacac aacagttgcc caagatcctg aaactgagct ctatgctgtt	600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat	660
ggacatttaa gactgaatca gaccttcaac tggaaataca cggcggtgg cggcggaggc	720
ggtggcgggt cgggagctga ggtcccggtg gtgtgggccc aggagggggc tcctgcccag	780
ctcccctgca gccccacaat ccccctccag gatctcagcc ttctgcgaag agcaggggtc	840
acttggcagc atcagccaga cagtggcccg cccgctgccg cccccggcca tcccctggcc	900
cccggccctc acccggcggc gccctctcc tgggggcca ggcccagcgg ctacacgggtg	960
ctgagcgtgg gtcccggagg cctgctcagc gggaggctgc ccctgcagcc ccgctccag	1020

10

ES 2 810 424 T3

ctggatgagc gcggccggca gcgcggggac ttctcgctat ggctgcgcc agcccggcgc 1080
 gcggacgccg gcgagtaccg cgccgcggtg cacctcaggg accgcgccct ctctgcccgc 1140
 ctccgtctgc gcctgggcca ggcctcgatg actgccagcc ccccaggatc tctcagagcc 1200
 tccgactggg tcattttgaa ctgctccttc agccgccctg accgcccagc ctctgtgcat 1260
 tggtttcgga accggggcca gggccgagtc cctgtccggg agtccccca tcaccactta 1320
 gcggaagct tcctcttctt gccccaagtc agcccatgg actctgggccc ctggggctgc 1380
 atcctcacct acagagatgg cttcaacgtc tccatcatgt ataacctcac tgttctgggt 1440
 ctgctggtgc cccggggctc cgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac aagcccaccg 1500
 agcccagcac ctgaactcct ggggggatcc tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 1560
 gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcaatgag tgggtggtgga cgtgagccac 1620
 gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag 1680
 acaaagccgc gggaggagca gtaccagagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctgc 1740
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 1800
 ccagccccc a tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1860
 tacaccctgc ccccatctcg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1920
 gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1980
 aacaactaca agaccacgcc tcccgctgctg gactccgacg gctccttctt cctatacagc 2040
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 2100
 catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 2160

<210> 8

<211> 719

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica traducida variante 1 de constructo humano de CTLA-4 BsB

<400> 8

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
 1 5 10 15

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
 20 25 30

Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
 35 40 45

10

ES 2 810 424 T3

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
65 70 75 80

Met Asn Ile Ala Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
85 90 95

Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
115 120 125

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

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
145 150 155 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
165 170 175

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ala Gln Asp
180 185 190

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
195 200 205

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
210 215 220

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly
245 250 255

Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu
260 265 270

Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser
275 280 285

Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His
290 295 300

ES 2 810 424 T3

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Glu Arg Tyr Thr Val
 305 310 315 320

Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln
 325 330 335

Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser
 340 345 350

Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala
 355 360 365

Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg
 370 375 380

Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala
 385 390 395 400

Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro
 405 410 415

Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val
 420 425 430

Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro
 435 440 445

Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr
 450 455 460

Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly
 465 470 475 480

Leu Leu Val Pro Arg Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 485 490 495

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 500 505 510

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 515 520 525

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 530 535 540

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 545 550 555 560

ES 2 810 424 T3

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
565 570 575

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
580 585 590

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
595 600 605

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
610 615 620

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
625 630 635 640

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
645 650 655

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
660 665 670

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
675 680 685

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
690 695 700

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715

<210> 9

<211> 2160

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica variante 2 de constructo humano de CTLA-4 BsB

<400> 9

atgggccaca cacggaggca ggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt	60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag	120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca	180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac	240
atgaatatag cccccagtag caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc	300
attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag	360

10

ES 2 810 424 T3

tatgaaaaag acgctttcaa gcggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct 420
gacttcoccta cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaataat tagaaggata 480
atgtgctcaa cctctggagg tttccagag cctcacctct cctggttggg aaatggagaa 540
gaattaaatg ccatcaaac aacagttgcc caagatctg aaactgagct ctatgctgtt 600
gccagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat 660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggatacaaa ccggcgggtg cgggggaggc 720
ggtggcgggt ccggagctga ggtcccggtg gtgtggggccc aggagggggc tcctgcccag 780
ctcccctgca gccccacaat ccccctccag gatctcagcc ttctcgaag agcaggggtc 840
acttggcagc atcagccaga cagtggcccc cccgctgccg cccccggcca tcccctggcc 900
cccggccctc acccggcggc gcctcctcc tgggggcca ggcccagcg ctacacggtg 960
ctgagcgtgg gtcccggagg cctgcgcagc gggaggctgc ccctgcagcc ccgctccag 1020
ctggatgagc gcggccggca gcgcggggac ttctcgtat ggctgcgcc agcccggcgc 1080
gcggagcccg gcgagtaccg ccggcgggtg cacctcaggg accgcgccct ctctgccgc 1140
ctcgtctgc gcctgggcca ggctcgtat actgccagcc ccccaggatc tctcagagcc 1200
tccgactggg tcattttgaa ctgctccttc agccgccctg accgccagc ctctgtgcat 1260
tggtttcgga accggggcca gggccgagtc cctgtccggg agtccccca tcaccactta 1320
gcggaaagct tcctcttct gcccagaatc agcccctgg actctgggccc ctggggctgc 1380
atcctcacct acagagatgg cttcaacgct tccatcatgt ataacctac tgttctgggt 1440
ctgctggtgc cccggggctc cgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac aagcccaccg 1500
agcccagcac ctgaactcct ggggggatcc tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 1560
gacaccctca tgatctccc gaccctgag gtcacatgcg tggagggtga cgtgagccac 1620
gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggagggtga taatgccaag 1680
acaaagccgc gggaggagca gtaccagagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctc 1740
ctgcaccag actggtgaa tggcaaggag tacaagtga aggtctcaa caaagcctc 1800
ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaaggc agccccgaga accacaggtg 1860
tacaccctgc cccatctcg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1920
gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1980
aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctatacagc 2040
aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 2100
catgaggctc tgcacaacca ctacacgagc aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 2160

<210> 10

<211> 719

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica traducida variante 2 de constructo humano de CTLA-4

ES 2 810 424 T3

<400> 10

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
1 5 10 15

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
20 25 30

Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
35 40 45

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
65 70 75 80

Met Asn Ile Ala Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
85 90 95

Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
115 120 125

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

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
145 150 155 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
165 170 175

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ala Gln Asp
180 185 190

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ala Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
195 200 205

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
210 215 220

ES 2 810 424 T3

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly
 245 250 255

Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu
 260 265 270

Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser
 275 280 285

Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His
 290 295 300

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Glu Arg Tyr Thr Val
 305 310 315 320

Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln
 325 330 335

Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser
 340 345 350

Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala
 355 360 365

Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg
 370 375 380

Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala
 385 390 395 400

Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro
 405 410 415

Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val
 420 425 430

Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro
 435 440 445

Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr
 450 455 460

Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly

ES 2 810 424 T3

<400> 11

atgggccaca cacggaggca gggaaacatca ccatccaagt gtccatacct caatctcttt	60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag	120
gaagtgaaag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca	180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac	240
atgaatatat ggcccagta caagaaccgg accatctttg atatcaactaa taacctctcc	300
attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag	360
tatgaaaaag acgctttcaa gcgggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct	420
gacttcctca cacctagtat atctgacttt gaaattccaa cttctaataat tagaaggata	480
atgtgctcaa cctctggagg tttccagag cctcacctct cctggttga aaatggagaa	540
gaattaaatg ccatcaaac aacagttgcc caagatctg aaactgccct ctatgctgtt	600
agcagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat	660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tgggaatacaa ccggcgggtg cgggggaggc	720
ggtggcgggt ccggagctga ggtcccgggt gtgtggggccc aggagggggc tcctgcccag	780
ctcccctgca gccccacaat ccccctccag gatctcagcc ttctgcgaag agcaggggtc	840
acttggcagc atcagccaga cagtggcccc cccgctgccg cccccggcca tcccctggcc	900
cccggccctc acccggcggc gcctcctcc tgggggccc ggcccagcgc ctacacggtg	960
ctgagcgtgg gtcccggagg cctgcgcagc gggaggctgc ccctgcagcc ccgctccag	1020
ctggatgagc gcggccggca gcgcggggac ttctcgtat ggctgcgcc agcccggcgc	1080
gcggacgccg gcgagtaccg cgcgcgggtg cacctcaggg accgcgcct ctctgccgc	1140
ctcgtctgc gcctgggcca ggctcgtat actgccagcc ccccaggatc tctcagagcc	1200
tccgactggg tcattttgaa ctgctccttc agccgccctg accgcccagc ctctgtgcat	1260
tggtttcgga accggggcca gggcgcagtc cctgtccggg agtcccccca tcaccactta	1320
gcggaaagct tcctcttct gccccaagtc agccccatgg actctgggccc ctggggctgc	1380
atcctcacct acagagatgg cttcaacgtc tccatcatgt ataacctcac tgttctgggt	1440
ctgctggtgc cccggggctc cgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac aagcccaccg	1500
agcccagcac ctgaactcct ggggggatcc tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag	1560
gacaccctca tgatctccc gaccctgag gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac	1620

ES 2 810 424 T3

gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 1680
 acaaagccgc gggaggagca gtaccagagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 1740
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 1800
 ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1860
 tacaccctgc ccccatctcg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1920
 gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1980
 aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctatacagc 2040
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag cagggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 2100
 catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 2160

<210> 12

<211> 720

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica traducida variante 3 de constructo humano de CTLA-4 BsB

<400> 12

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

10

ES 2 810 424 T3

Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala
 385 390 395 400
 Ser Asp Val Val Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg
 405 410 415
 Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro
 420 425 430
 Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu
 435 440 445
 Pro Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr
 450 455 460
 Tyr Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu
 465 470 475 480
 Gly Leu Leu Val Pro Arg Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 485 490 495
 His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser
 500 505 510
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 515 520 525
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 530 535 540
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 545 550 555 560
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val
 565 570 575
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 580 585 590
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 595 600 605
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 610 615 620
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 625 630 635 640

ES 2 810 424 T3

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
645 650 655

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
660 665 670

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
675 680 685

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
690 695 700

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715 720

<210> 13

<211> 2160

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica variante 4 de constructo humano de CTLA-4 BsB

<400> 13

atgggccaca cacggaggca gggaacatca ccatccaagt gtccatacct caatttcttt	60
cagctcttgg tgctggctgg tctttctcac ttctgttcag gtgttatcca cgtgaccaag	120
gaagtгааag aagtggcaac gctgtcctgt ggtcacaatg tttctgttga agagctggca	180
caaactcgca tctactggca aaaggagaag aaaatggtgc tgactatgat gtctggggac	240
atgaatatat ggcccagta caagaaccgg accatctttg atatcactaa taacctctcc	300
attgtgatcc tggctctgcg cccatctgac gagggcacat acgagtgtgt tgttctgaag	360
tatgaaaaag acgctttcaa gcggaacac ctggctgaag tgacgttatc agtcaaagct	420
gacttccta cacctagtat atctgacttt gaaattcaa cttctaatat tagaaggata	480
atgtgctcaa cctctggagg tttccagag cctcacctct cctggttggg aaatggagaa	540
gaattaaatg ccatcaacac aacagttgcc caagatcctg aaactgccct ctatgctgtt	600
gccagcaaac tggatttcaa tatgacaacc aaccacagct tcatgtgtct catcaagtat	660
ggacatttaa gagtgaatca gaccttcaac tggaaataca cggcggtgg cggcggaggc	720
ggtggcggtt ccggagctga ggtcccggtg gtgtgggcc aggagggggc tcctgccag	780
ctcccctgca gccccacaat ccccctccag gatctcagcc ttctgcgaag agcaggggtc	840
acttggcagc atcagccaga cagtggccc cccgctgcc cccccggcca tcccctggcc	900
cccgccctc acccgggggc gccctctcc tgggggcca ggcccagagc ctacacggtg	960
ctgagcgtgg gtcccggagg cctgctcagc gggaggctgc ccctgcagcc ccgctccag	1020

10

ES 2 810 424 T3

ctggatgagc gcgccgggca ggcggggac ttctcgctat ggctgcgcc agcccggcgc 1080
 gcggacgccg gcgagtaccg cgccgcggtg cacctcaggg accgcgccct ctctgcccgc 1140
 ctccgtctgc gcctgggcca ggcctcgatg actgccagcc ccccaggatc tctcagagcc 1200
 tccgactggg tcattttgaa ctgctccttc agccgccctg accgcccagc ctctgtgcat 1260
 tggtttcgga accggggcca gggccgagtc cctgtccggg agtccccca tcaccactta 1320
 gcggaagct tcctcttctt gccccaagtc agcccatgg actctgggccc ctggggctgc 1380
 atcctcacct acagagatgg cttcaacgtc tccatcatgt ataacctcac tgttctgggt 1440
 ctgctggtgc cccggggctc cgagcccaaa tcttgtgaca aaactcacac aagcccaccg 1500
 agcccagcac ctgaactcct ggggggatcc tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 1560
 gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcaatgag tgggtggtgga cgtgagccac 1620
 gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag 1680
 acaaagccgc gggaggagca gtaccagagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctgc 1740
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 1800
 ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 1860
 tacaccctgc ccccatctcg ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1920
 gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1980
 aacaactaca agaccagcc tcccgctg gactccgag gctccttctt cctatacagc 2040
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 2100
 catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 2160

<210> 14

<211> 719

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia proteica traducida variante 4 de constructo humano de CTLA-4 BsB

<400> 14

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
 1 5 10 15

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
 20 25 30

Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
 35 40 45

10

ES 2 810 424 T3

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
65 70 75 80

Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
85 90 95

Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
115 120 125

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

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
145 150 155 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
165 170 175

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ala Gln Asp
180 185 190

Pro Glu Thr Ala Leu Tyr Ala Val Ala Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
195 200 205

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
210 215 220

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly
225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Gly Ala Glu Val Pro Val Val Trp Ala Gln Glu Gly
245 250 255

Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile Pro Leu Gln Asp Leu
260 265 270

Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln His Gln Pro Asp Ser
275 280 285

Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu Ala Pro Gly Pro His
290 295 300

ES 2 810 424 T3

Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro Glu Arg Tyr Thr Val
 305 310 315 320
 Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly Arg Leu Pro Leu Gln
 325 330 335
 Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln Arg Gly Asp Phe Ser
 340 345 350
 Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala Gly Glu Tyr Arg Ala
 355 360 365
 Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys Arg Leu Arg Leu Arg
 370 375 380
 Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro Gly Ser Leu Arg Ala
 385 390 395 400
 Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser Arg Pro Asp Arg Pro
 405 410 415
 Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln Gly Arg Val Pro Val
 420 425 430
 Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser Phe Leu Phe Leu Pro
 435 440 445
 Gln Val Ser Pro Met Asp Ser Gly Pro Trp Gly Cys Ile Leu Thr Tyr
 450 455 460
 Arg Asp Gly Phe Asn Val Ser Ile Met Tyr Asn Leu Thr Val Leu Gly
 465 470 475 480
 Leu Leu Val Pro Arg Gly Ser Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 485 490 495
 Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
 500 505 510
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 515 520 525
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 530 535 540
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 545 550 555 560

ES 2 810 424 T3

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
565 570 575

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
580 585 590

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
595 600 605

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
610 615 620

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
625 630 635 640

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
645 650 655

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
660 665 670

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
675 680 685

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
690 695 700

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
705 710 715

<210> 15

<211> 288

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 15

Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
1 5 10 15

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
20 25 30

Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
35 40 45

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
50 55 60

ES 2 810 424 T3

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
65 70 75 80

Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
85 90 95

Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
115 120 125

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

Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
145 150 155 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
165 170 175

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
180 185 190

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
195 200 205

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
210 215 220

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro
225 230 235 240

Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly
245 250 255

Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg
260 265 270

Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
275 280 285

<210> 16

<211> 1485

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN de BsBdelta (CD80wa-Fc)

<400> 16

ES 2 810 424 T3

atggccttgca attgtcagtt gatgcaggat acaccactcc tcaagtttcc atgtccaagg 60
ctcattcttc tctttgtgct gctgattcgt ctttcacaag tgtcttcaga tgttgatgaa 120
caactgtcca agtcagtgaa agataaggta ttgctgcctt gccgttacia ctctcctcat 180
gaagatgagt ctgaagaccg aatctactgg caaaaacatg acaaagtggg gctgtctgtc 240
attgctggga aactaaaagt ggcgcccag tataagaacc ggactttata tgacaacact 300
acctactctc ttatcatcct ggccttggtc ctttcagacc ggggcacata cagctgtgtc 360
gttcaaaaga aggaaagagg aacgatgaa gttaaacact tggctttagt aaagttgtcc 420
atcaaagctg acttctctac ccccaacata actgagctcg gaaacccatc tgcagacact 480
aaaaggatta cctgctttgc ttccgggggt ttcccaaagc ctcgcttctc ttggttgaa 540
aatggaagag aattacctgg catcaatacg acaatttccc aggatcctga atctgaattg 600
tacaccatta gtagccaact agatttcaat acgactcgca accacacat taagtgtctc 660
attaaatatg gagatgctca cgtgtcagag gacttcacct gggagcccag agggcccaca 720
atcaagccct gtcctccatg caaatgccca gcacctaac tcttgggtgg accatccgtc 780
ttcatcttcc ctccaaagat caaggatgta ctcatgatct ccctgagccc catggtcaca 840
tgtgtgggtg tggatgtgag cgaggatgac ccagatgtcc agatcagctg gttcgtgaac 900
aacgtggaag tactcacagc tcagacacaa acccatagag aggattacia cagtactctc 960
cgggtgggtca gtgccctccc catccagcac caggactgga tgagtggcaa ggagttcaaa 1020
tgcaaggtca acaacaaagc cctcccagcg cccatcgaga gaacctctc aaaacccaaa 1080
gggtcagtaa gagctccaca ggtatatgtc ttgcctccac cagaagaaga gatgactaag 1140
aaacaggtca ctctgacctg catggtcaca gacttcatgc ctgaagacat ttacgtggag 1200
tggaccaaca acgggaaaac agagctaaac tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct 1260
gatggttctt acttcatgta cagcaagctg agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga 1320
aatagctact cctgctcagt ggtccacgag ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc 1380
ttctcccgga ctccgggtaa aggcgggtggc ggcggagcg gtggcgggtg gcctgggaaa 1440
gagctgggtc tggagcccgt agcccacat caccatcatc actga 1485

<210> 17

<211> 494

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de BsBdelta (CD80wa-Fc)

<400> 17

ES 2 810 424 T3

Met Ala Cys Asn Cys Gln Leu Met Gln Asp Thr Pro Leu Leu Lys Phe
1 5 10 15

Pro Cys Pro Arg Leu Ile Leu Leu Phe Val Leu Leu Ile Arg Leu Ser
20 25 30

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

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 Ala Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Leu
85 90 95

Tyr Asp Asn Thr Thr Tyr Ser Leu Ile Ile Leu Gly Leu Val Leu Ser
100 105 110

Asp Arg Gly Thr Tyr Ser Cys Val Val Gln Lys Lys Glu Arg Gly Thr
115 120 125

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
145 150 155 160

Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe
165 170 175

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

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 Pro Arg Gly Pro Thr
225 230 235 240

Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión biespecífica, que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC.
- 5 2. Una proteína de fusión biespecífica según la reivindicación 1, en la el ligando específico para CTLA-4 se selecciona de CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2), o un anticuerpo específico para CTLA-4.
3. Una proteína de fusión biespecífica según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el ligando específico para el complejo pMHC se selecciona de un anticuerpo anti-MHC y LAG-3.
4. Una proteína de fusión biespecífica según la reivindicación 2, en la que el ligando específico para CTLA-4 es CD80, preferiblemente un CD80 mutado para aumentar la especificidad por CTLA-4.
- 10 5. Una proteína de fusión biespecífica según la reivindicación 4, en la que CD80 es CD80 humano que comprende al menos una de las mutaciones W84A, K71G, K71V, S109G, R123S, R123D, G124L, S190A, S201A, R63A, M81A, N97A y E196A, preferiblemente W84A o E196A.
6. Una proteína de fusión biespecífica según la reivindicación 3, en la que el ligando específico para el complejo pMHC es LAG-3, preferiblemente LAG-3 mutado para aumentar la especificidad por pMHCII.
- 15 7. Una proteína de fusión biespecífica según la reivindicación 6, en la que LAG-3 es LAG-3 humano que comprende al menos una de las mutaciones R73E, R75A, R75E y R76E, preferiblemente R75A o R75E.
8. La proteína de fusión biespecífica de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso en la inducción de inmunotolerancia de una célula T, cuando la célula T se pone en contacto con una célula presentadora de antígeno la cual presenta un antígeno por medio de una molécula MHC y la proteína de fusión biespecífica.
- 20 9. La proteína de fusión biespecífica de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad autoinmunitaria y rechazo de trasplante.
10. La proteína de fusión biespecífica para uso según la reivindicación 9, en la que la proteína de fusión biespecífica se administra en combinación con un supresor o modulador inmunitario.
- 25 11. La proteína de fusión biespecífica para uso según la reivindicación 9 o reivindicación 10, en la que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de diabetes tipo 1 (DT1), lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), enfermedad intestinal inflamatoria (EII), colitis ulcerosa (CU), enfermedad de Crohn (EC), esclerosis múltiple (EM), esclerodermia, pénfigo vulgar (PV), psoriasis, dermatitis atópica, celiaquía, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves (tiroides), síndrome de Sjögren, síndrome de Guillain-Barré, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Addison, granulomatosis de Wegener, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmunitaria, polimialgia reumática, fenómeno de Raynaud, arteritis temporal, arteritis de células gigantes, anemia hemolítica autoinmunitaria, anemia perniciosa, panarteritis nudosa, enfermedad de Behçet, cirrosis biliar primaria, uveítis, miocarditis, fiebre reumática, espondilitis anquilosante, glomerulonefritis, sarcoidosis, dermatomiositis, miastenia grave, polimiositis, alopecia areata, y vitíligo.
- 30 12. La proteína de fusión biespecífica para uso según la reivindicación 11, en la que la enfermedad autoinmunitaria es diabetes tipo 1 (DT1).
- 35

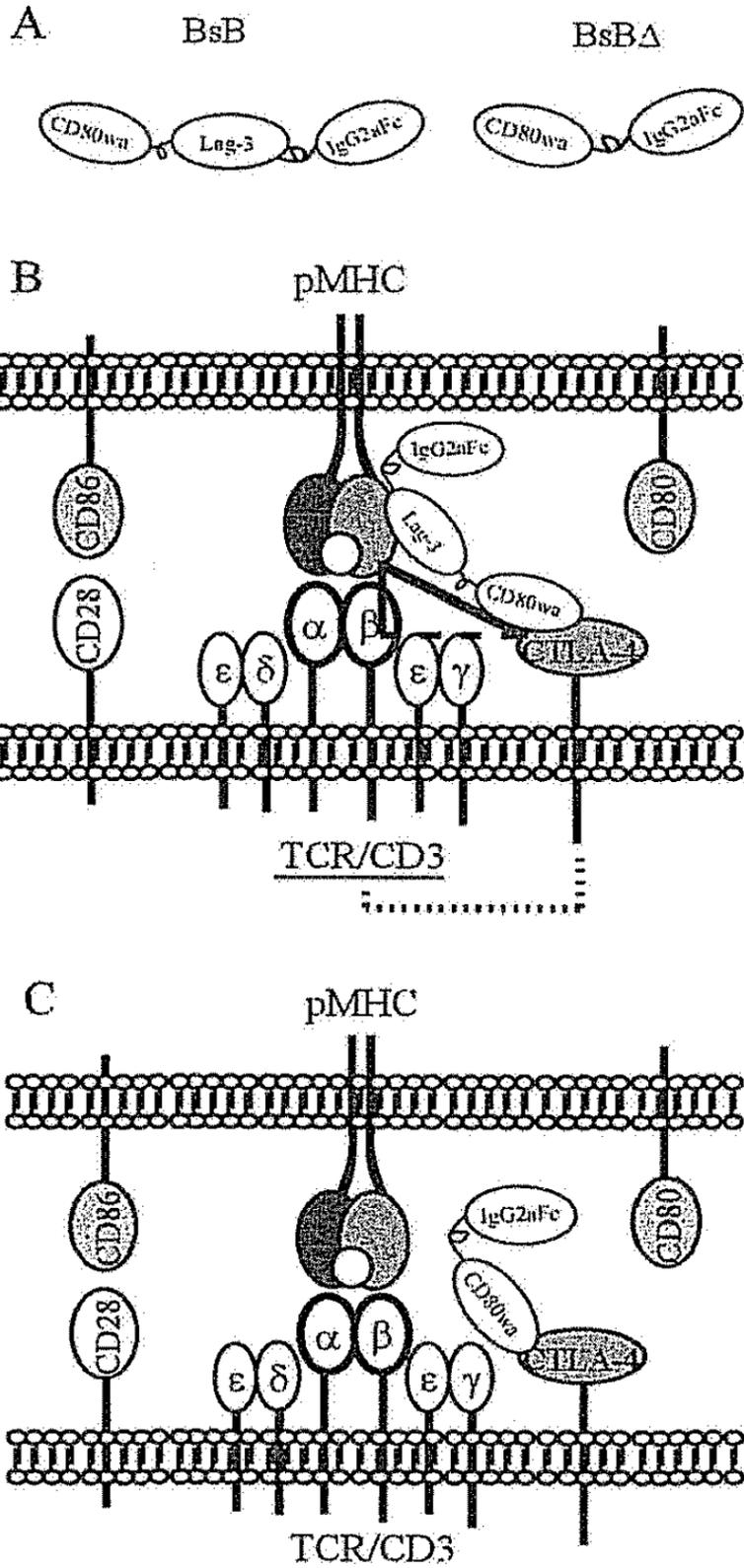


Figura 1

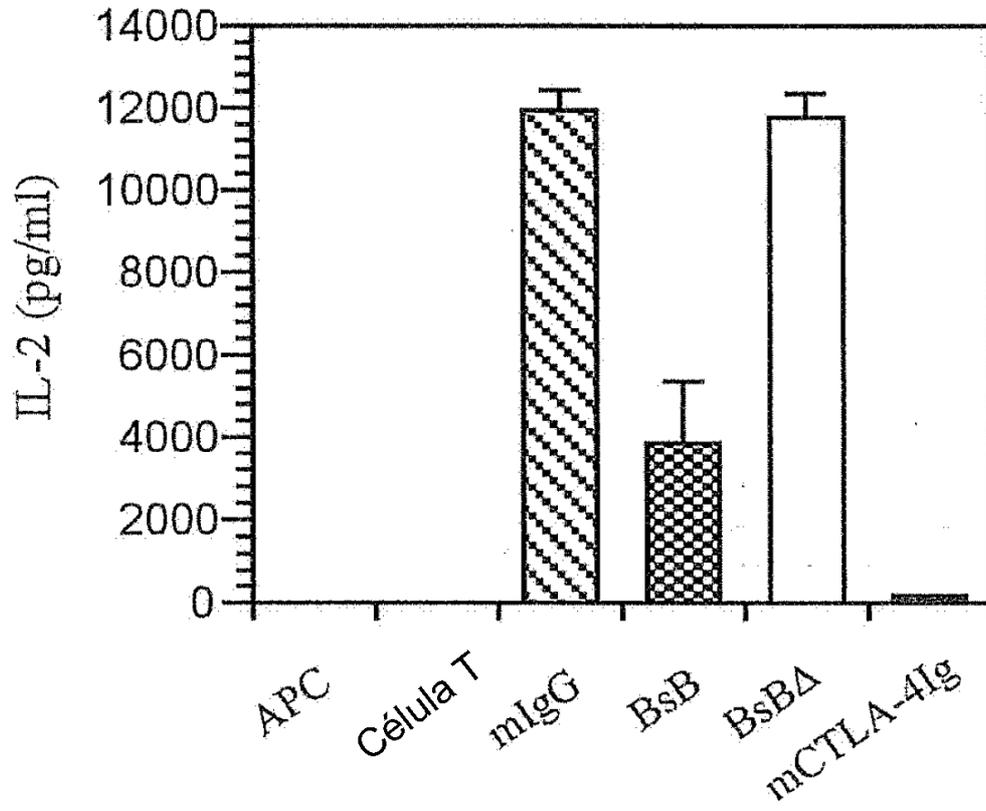
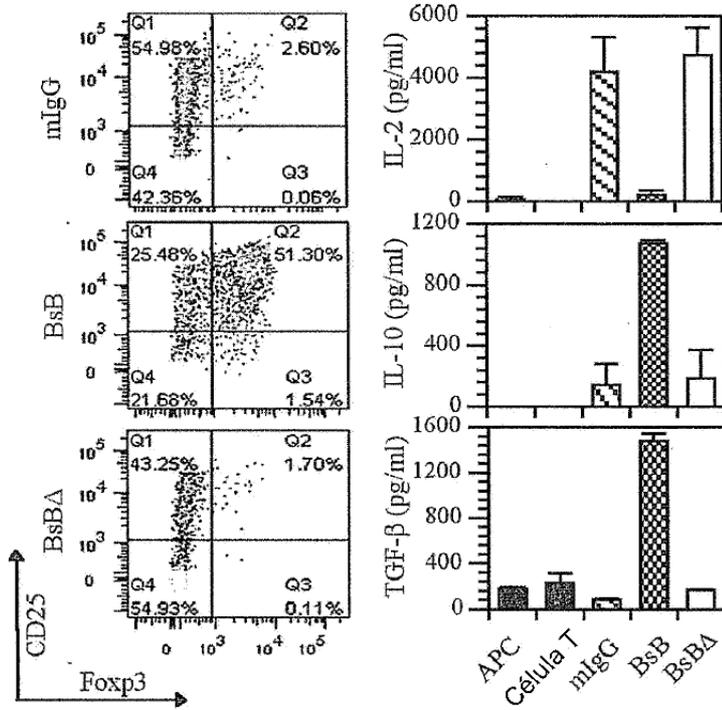


Figura 2

A



B

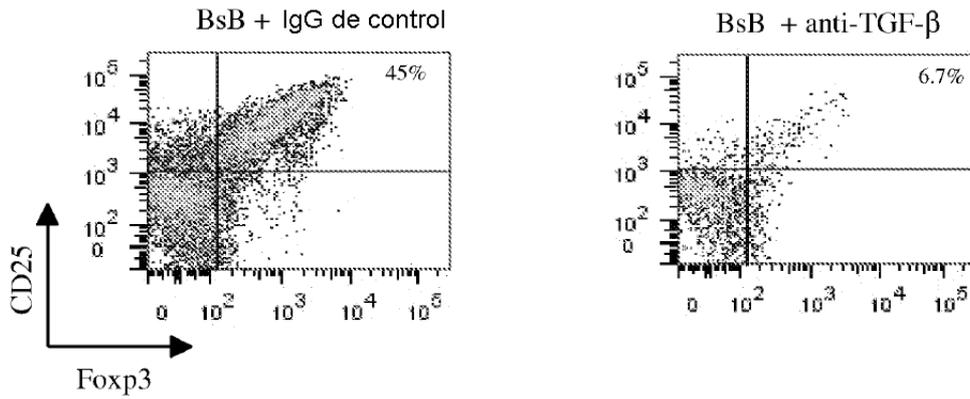


Figura 3

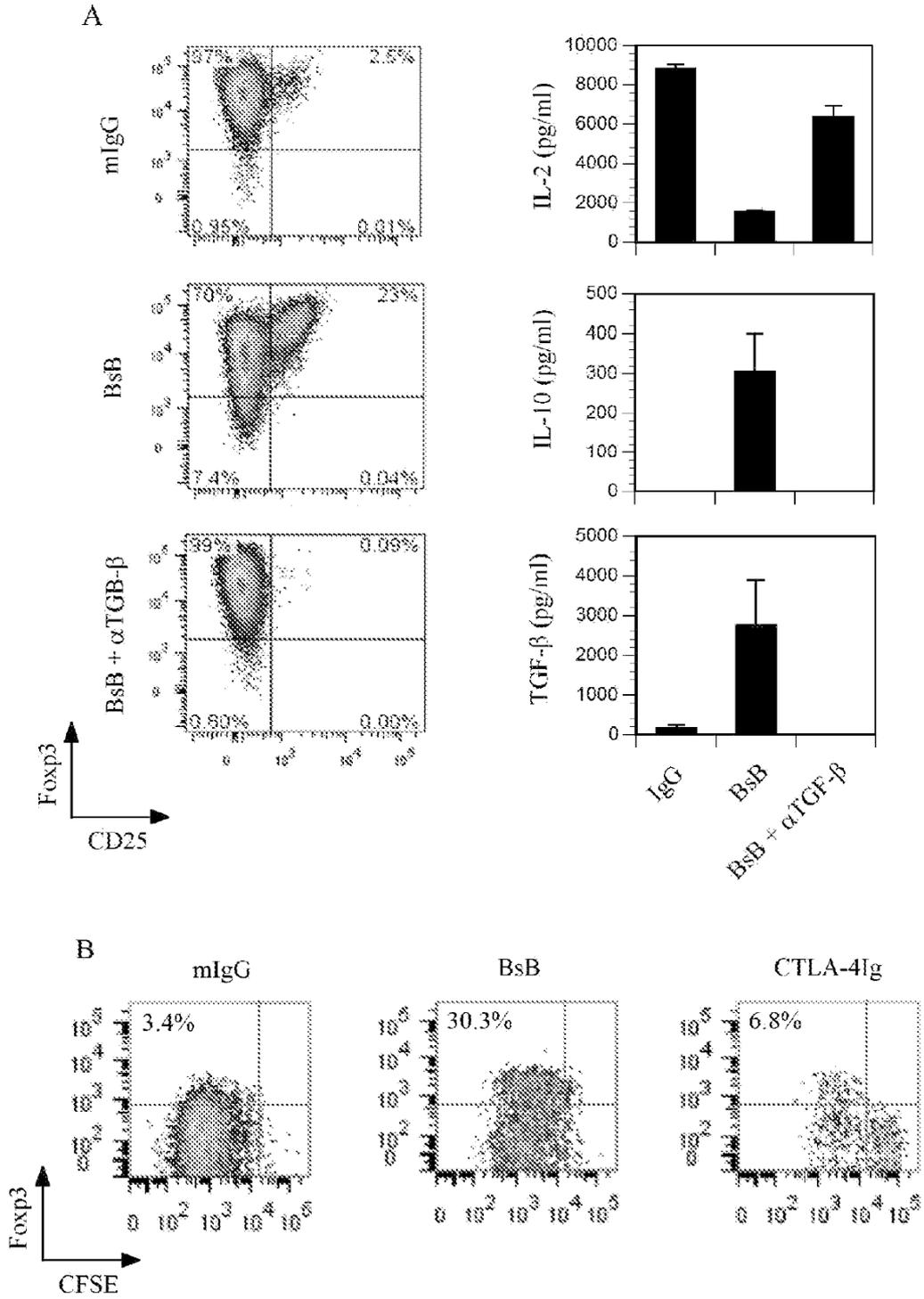


Figura 4

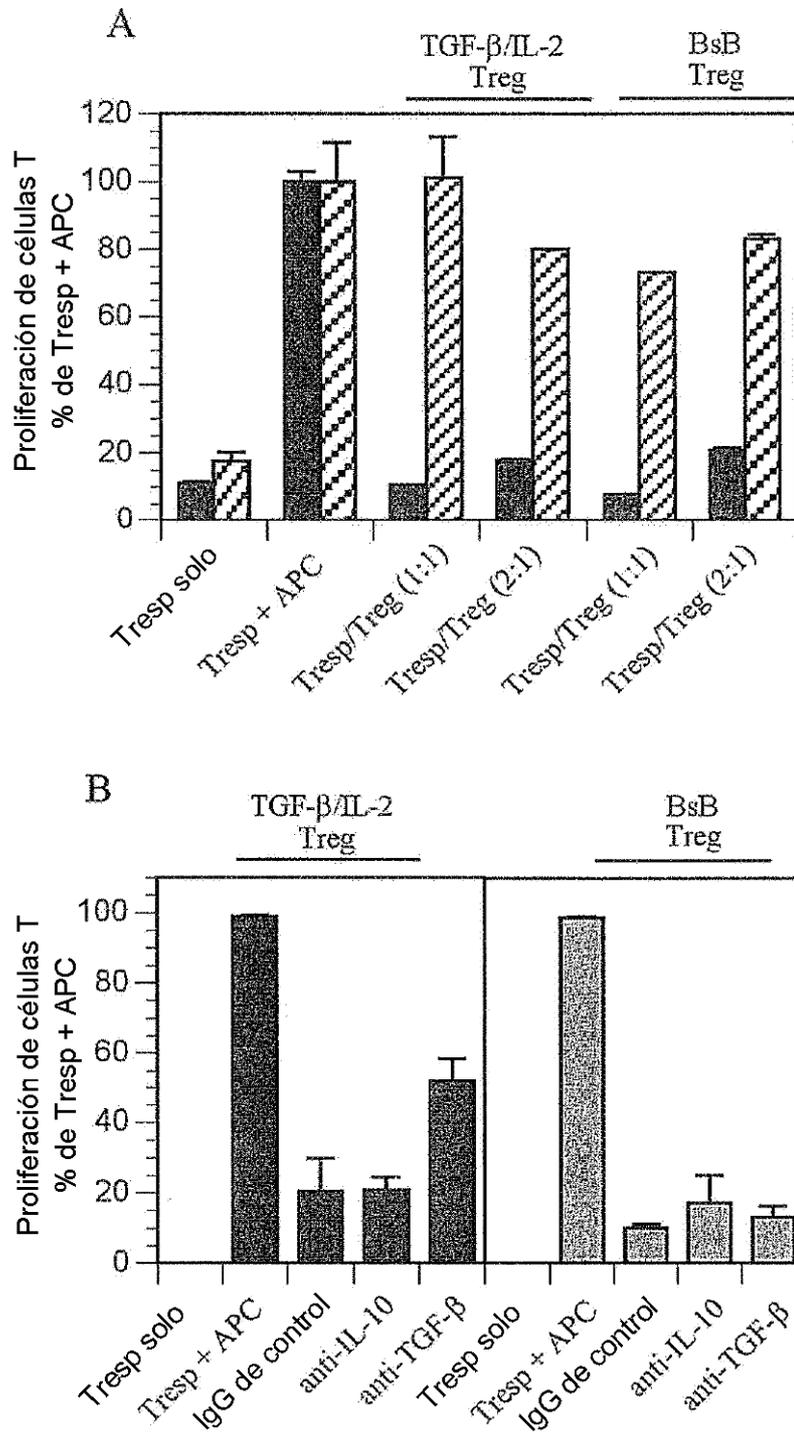


Figura 5

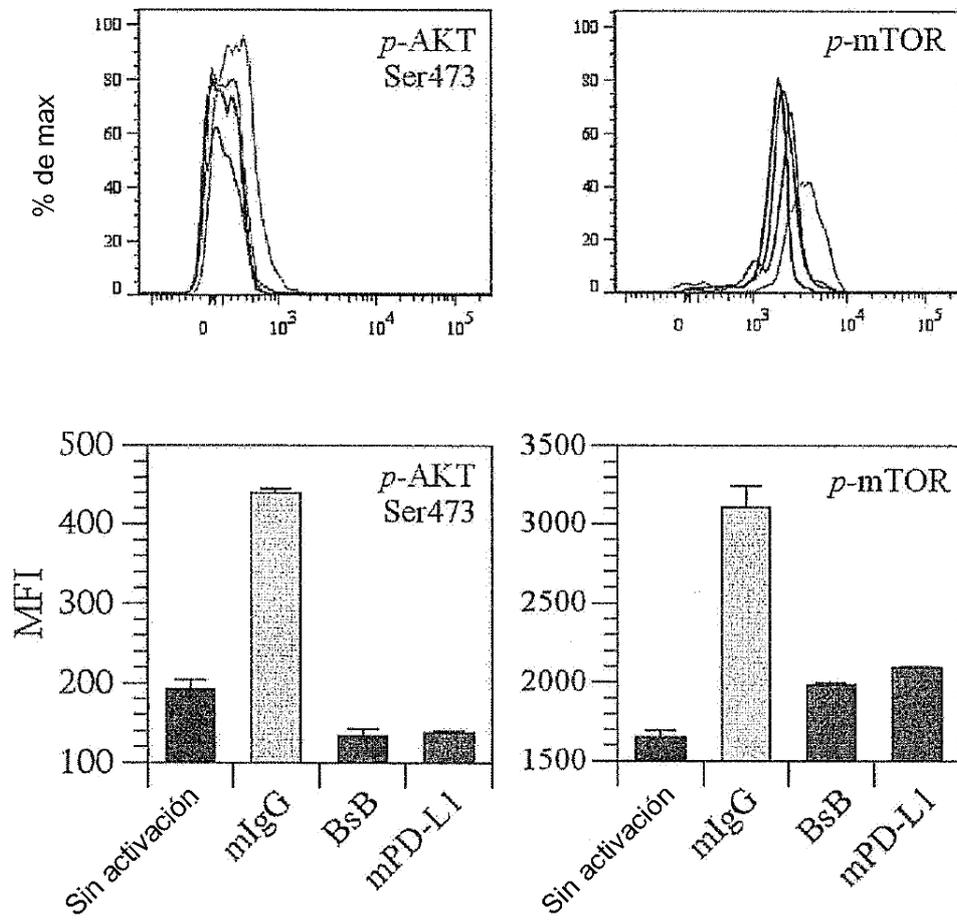


Figura 6

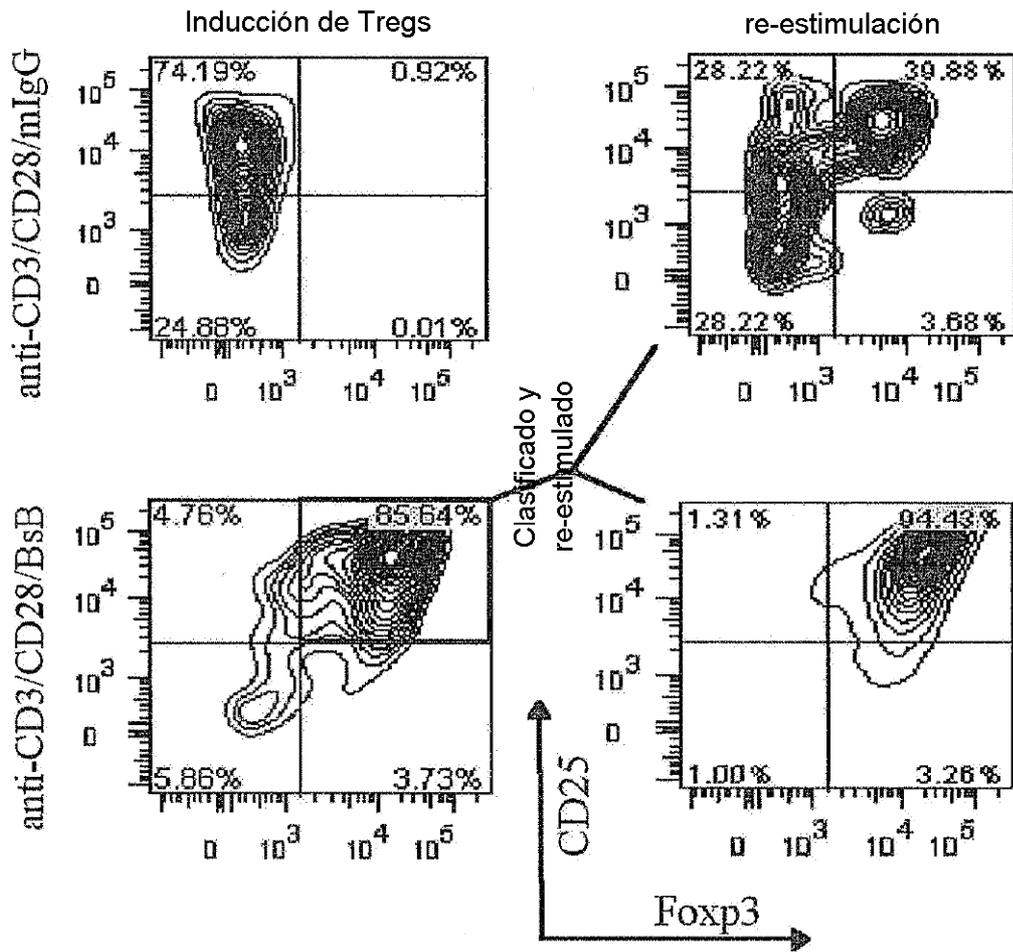
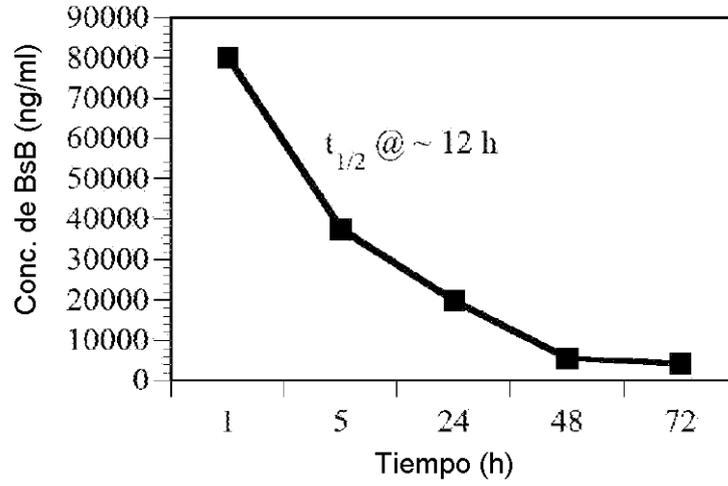


Figura 7

A



B

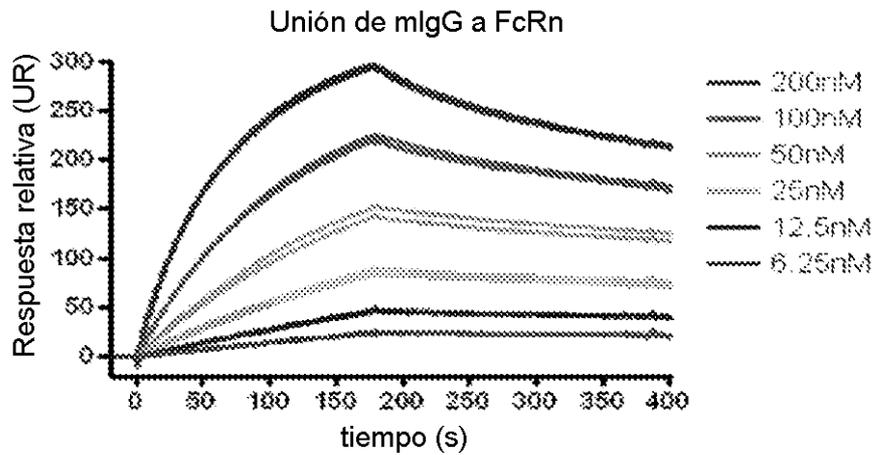
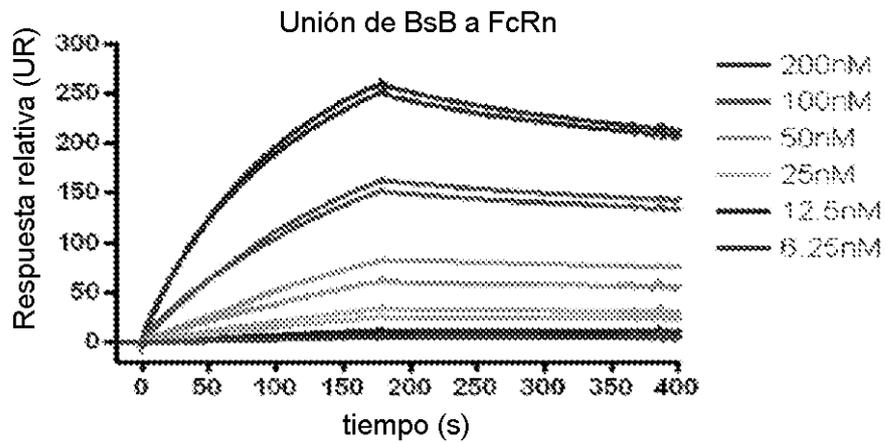


Figura 8

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

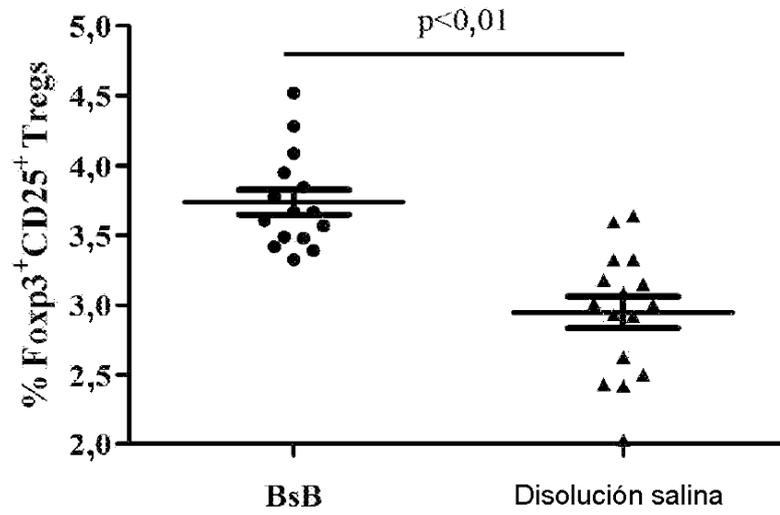
 N. N.

 N.

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

Figura 9

A



B

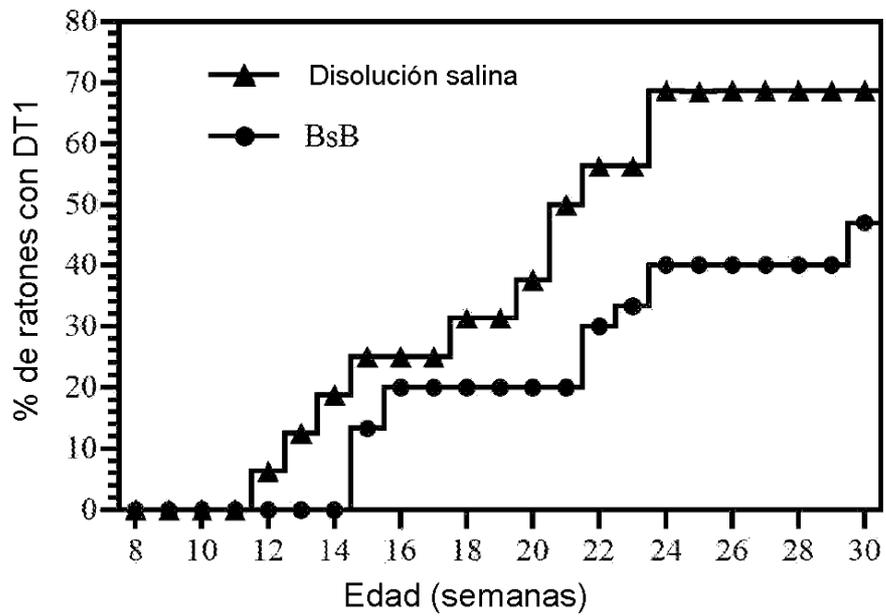
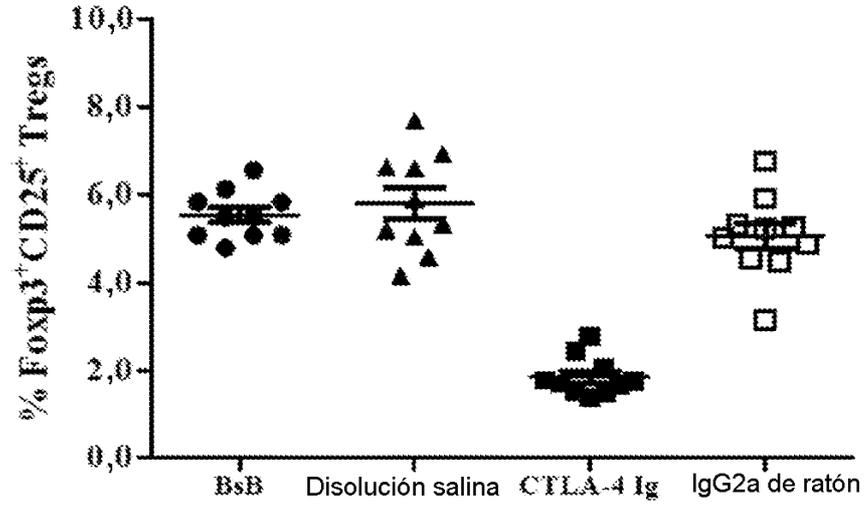


Figura 10

A



B

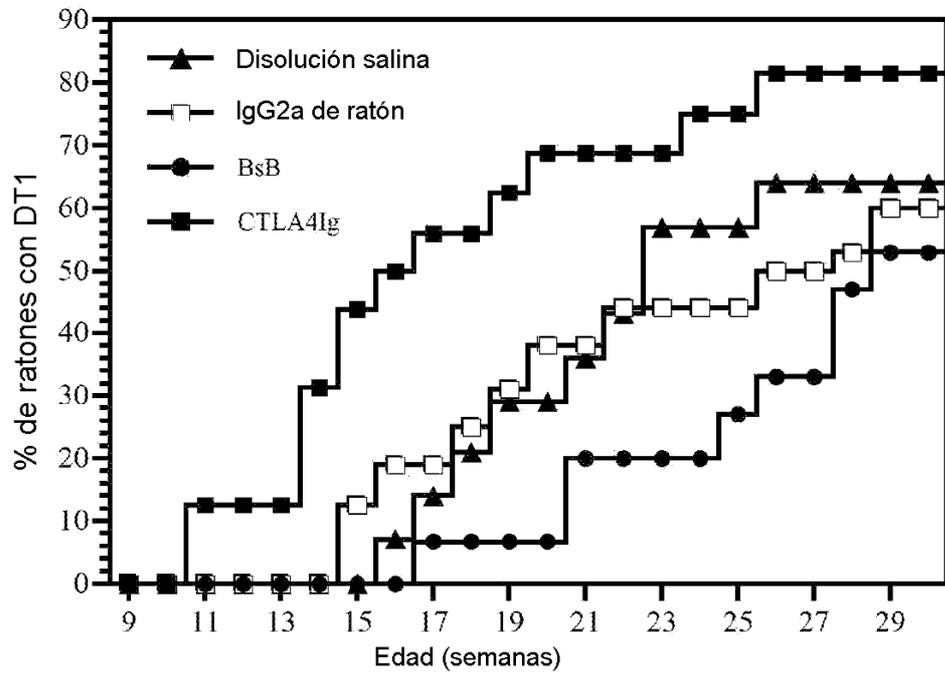
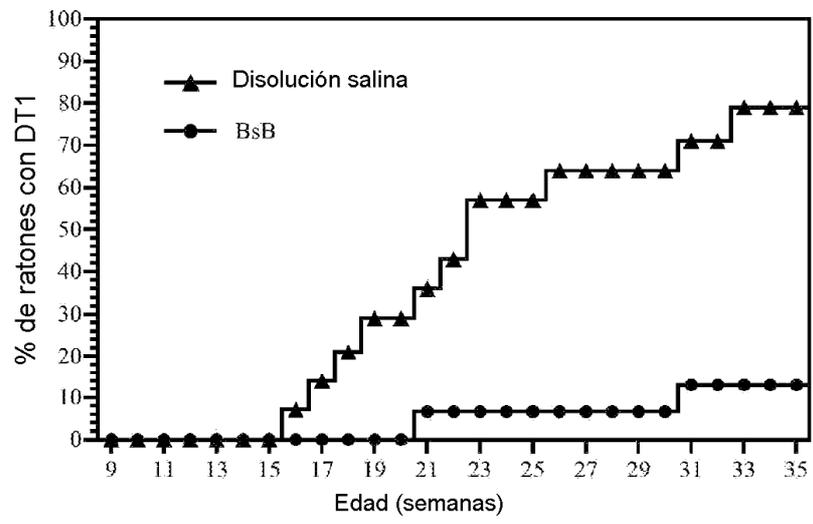


Figura 11

A



B

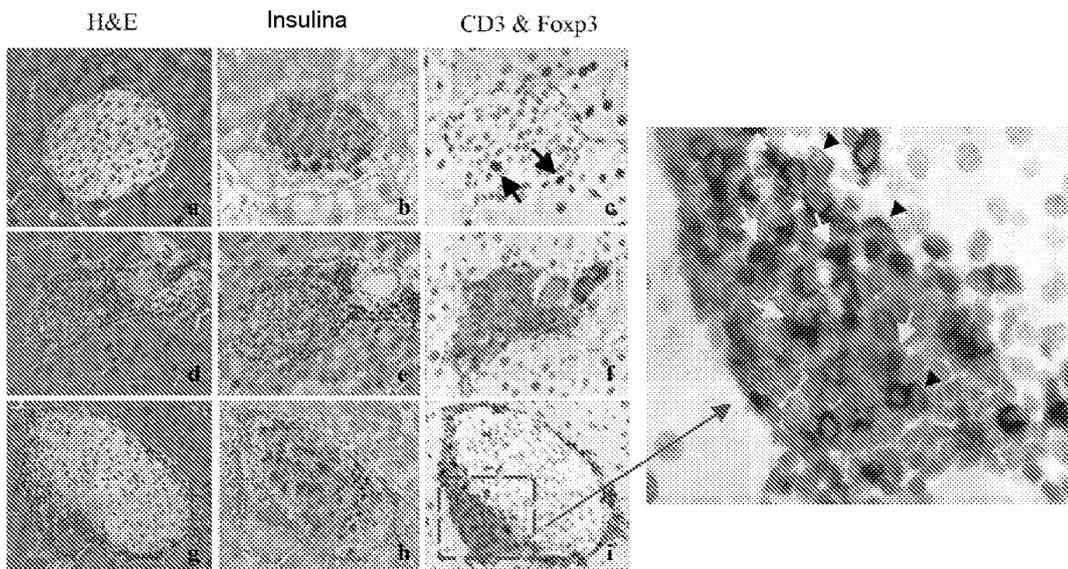


Figura 12