

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 826 894**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2011** **E 15198516 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020** **EP 3053932**

54 Título: **Nuevas inmunoadhesinas CTLA4-IG**

30 Prioridad:

19.02.2010 US 306311 P

14.05.2010 US 334806 P

10.11.2010 US 412309 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
19.05.2021

73 Titular/es:

XENCOR, INC. (100.0%)
111 W. Lemon Avenue
Monrovia, CA 91016 , US

72 Inventor/es:

LAZAR, GREGORY, A. y
BERNETT, MATTHEW, J.

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 826 894 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

Nuevas inmunoadhesinas CTLA4-Ig

5 Campo de la invención

La presente solicitud se refiere a inmunoadhesinas CTLA4-Ig que se dirigen a CD80 y CD86, y su uso, en particular para fines terapéuticos.

10 Antecedentes de la invención

Los linfocitos T desempeñan un papel central en la respuesta inmunitaria adaptativa a antígeno. Las células T sin modificar requieren dos señales para su plena activación (Bretscher 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96: 185-90). La primera señal es específica del antígeno y es proporcionada por la interacción del receptor de células T (TCR) con el complejo MHC/péptido en una célula presentadora de antígeno (APC). La segunda señal es una señal coestimuladora proporcionada por las interacciones entre los receptores de la célula T y sus ligandos en la APC. El acoplamiento de ambos TCR/MHC y las interacciones coestimuladoras conduce a la activación de las células T a través de un número de vías intracelulares, incluyendo calcio-calcineurina y proteína quinasa RAS activada por mitógenos, y la posterior activación de factores de transcripción para un número de compuestos efectores, incluyendo citoquinas, tales como IL-2. Estos eventos conducen a la proliferación de células T, la generación de un grupo de células T auxiliares CD4⁺ (TH), y la expansión de células T CD8⁺ citotóxicas activadas. No sólo es la coestimulación crítica para la activación de células T completa, su ausencia durante TCR/MHC de compromiso da como resultado anergia y/o apoptosis.

Aunque están involucradas múltiples vías coestimuladoras positivas y negativas en la regulación de células T, las más críticas son entre CD28 en las células T y B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) en APC. CD28 promueve la diferenciación de células T en células de fenotipo Th1 y aumenta la producción de anticuerpos por las células B y la activación de células T. B7-1 y B7-2, expresados en APC, tales como células dendríticas (DC) y células B, tienen funciones superpuestas pero distintas. B7-2 se expresa constitutivamente y está regulada positivamente rápidamente en APC coincidentes con el compromiso de TCR/MHC (señal 1). La expresión de B7-1 es muy baja en la célula en reposo, pero se induce normalmente después de la estimulación prolongada de células T. Estas diferencias sugieren que, si bien B7-2 puede ser importante en la inicialización de la activación de las células T, B7-1 puede jugar un papel más importante en la perpetuación de la respuesta inmunitaria.

Después de la activación de células T, un receptor de regulación negativa de linfocitos T citotóxicos antígeno 4 (CTLA4 o CTLA-4, también llamado CD152), está regulado positivamente en células T (Alegre et al, 2001, Nat Rev Immunol. 1: 220-8). CTLA4 es estructuralmente homóloga respecto a CD28, pero se une más estrechamente a ambos ligandos B7-1 y B7-2. CTLA4 inhibe la respuesta inmunitaria en dos principales formas, compite con CD28 para los ligandos B7 y, por lo tanto, bloquea la coestimulación, y también responde de forma negativa para inhibir la activación de células T (Krummel y Allison, 1995, J Exp Med 182: 459-465; Walunas et al, 1994, Immunity 1: 405-413). Un trabajo reciente ha demostrado que B7-2 involucra a CD28 más que a CTLA4 en la sinapsis inmunitaria, mientras que B7-1 se une más a CTLA4 que a CD28 (Collins et al, 2002, Immunity 17: 201-210; Jansson et al, 2005, J. Immunol 175: 1575-1585).

Debido al papel crítico de la vía B7 coestimuladora en la promoción y el mantenimiento de la respuesta inmunitaria, los agentes terapéuticos diseñados para antagonizarlo son prometedores para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y trastornos. Abatacept (Orencia®), es una inmunoadhesina CTLA4-Ig que consiste en el dominio de unión extracelular de CTLA4 unido al dominio Fc de una IgG humana. Abatacept fue desarrollado para inhibir la coestimulación mediada por B7 (Bluestone et al, 2006, Immunity 24: 233-238), y está aprobado para el tratamiento de la artritis reumatoide (AR) y en ensayos clínicos para un número de otras indicaciones autoinmunitarias. Sin embargo, mientras que abatacept muestra alguna actividad en el tratamiento de la AR, no es eficaz para otras indicaciones. Por ejemplo, CTLA4-Ig es mucho menos eficaz en la tolerancia contra el rechazo del trasplante (Kirk et al, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94: 8789-8794; Levisetti et al, 1997, J Immunol 159: 5187-5191).

El rendimiento clínico deficiente del abatacept se ha atribuido a su afinidad subóptima de CTLA4 nativa para los ligandos B7, particularmente B7-2 debido a su presunta importancia en la iniciación de la inmunidad. La presente invención proporciona nuevas variantes de inmunoadhesinas CTLA4-Ig con mejores afinidades B7 y actividades inhibitorias mejoradas de células T. Tales nuevas inmunoadhesinas son de beneficio en una variedad de aplicaciones, en particular para el tratamiento de trastornos relacionados con el sistema inmunológico, como se discute en detalle a continuación.

Resumen de la invención

En un aspecto, la invención proporciona una inmunoadhesina que comprende: un primer dominio que comprende un CTLA4 de SEQ ID NO:6 o una variante de CTLA4 en comparación con la SEQ ID NO: 6, en donde dicha variante de CTLA4 comprende al menos una modificación de aminoácido en una CTLA4 nativa, en donde dicha modificación es

una sustitución en la posición T51 del CTLA4, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1, B7-2, o tanto a B7-1 como B7-2; y un segundo dominio que comprende una región variante Fc de un polipéptido Fc de tipo salvaje, dicha variante Fc comprende las sustituciones de aminoácidos en la región Fc de dicho polipéptido Fc de tipo salvaje de M428L y N434S, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat.

En una realización dicha variante de CTLA4 comprende una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en T51N, A29H, M53Y, L61E, and K93Q, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1, B7-2 o B7-1 y B7-2, y en donde dicha variante comprende una combinación de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en A29H/T51N, T51 N/M53Y, A29H/T51 N/L61 E, T51 N/L61 E/K93Q, T51 N/M53Y/L61 E, A29H/T51 N/L61 E/K93Q, T51 N/M53Y/L61, E/K93Q y A29H/T51 N/M53Y/L61 E/K93Q.

En una realización dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1 y B7-2.

En una realización dicha variante comprende la combinación de las sustituciones A29H/T51N.

En una realización dicha variante comprende la combinación de las sustituciones T51N/M53Y.

En una realización dicha variante comprende la combinación de las sustituciones T51N/M53Y/L61E.

En una realización dicha variante comprende la combinación de las sustituciones T51N/L61E/K93Q.

En una realización dicha variante comprende la combinación de las sustituciones A29H/T51N/L61E/K93Q.

En un aspecto adicional la invención proporciona una inmunoadhesina de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento a un paciente con un trastorno relacionado con la inmunidad.

En una realización dicho trastorno relacionado con la inmunidad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, artritis psoriásica, psoriasis, artritis reumatoide, colitis ulcerosa y rechazo de trasplantes.

En un aspecto adicional la invención proporciona un ácido nucleico que codifica para la inmunoadhesina de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional la invención proporciona una célula huésped que comprende al ácido nucleico de la invención.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método de preparación de una inmunoadhesina que comprende el cultivo de la célula huésped de la invención bajo condiciones en donde se produce dicha inmunoadhesina.

La presente descripción proporciona nuevas inmunoadhesinas de CTLA4-Ig que inhiben las interacciones entre las células presentadoras de antígeno (APC) y células T. Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig de la descripción comprenden una porción de CTLA4 que se une con alta afinidad a B7-1 humana (CD80) y B7-2 (CD86), y comprenden una porción Fc de Ig (o región Fc) que se puede unir a uno o más receptores Fc o ligandos Fc.

En un caso, la inmunoadhesina CTLA4-Ig comprende una variante de la proteína CTLA4, en donde dicha variante comprende al menos una modificación de aminoácido en una proteína CTLA4 nativa, en donde dicha modificación es una sustitución seleccionada del grupo que consiste en A29E, A29F, A29H, A29K, A29N, A29Q, A29R, T30E, T30H, T30R, T30V, E31D, E31I, E31M, E31T, E31V, R33E, R33F, R33I, R33L, R33M, R33Q, R33T, R33W, R33Y, T35D, T35E, T35F, T35M, T35V, T35Y, A49D, A49E, A49F, A49T, A49W, A49Y, T51D, T51E, T51H, T51L, T51N, T51Q, T51R, T51S, T51V, M53E, M53F, M53H, M53Q, M53W, M53Y, T59H, T59I, T59L, T59N, T59Q, T59V, T59Y, L61A, L61D, L61E, L61F, L61G, L61H, L61I, L61K, L61M, L61N, L61P, L61Q, L61R, L61S, L61T, L61V, L61W, L61Y, D63E, S64K, S64R, S64Y, K93D, K93E, K93F, K93H, K93N, K93Q, K93R, K93S, K93T, K93V, K93W, K93Y, E95D, E95H, E95L, E95Q, E95Y, M97D, M97F, M97I, M97N, M97V, Y98F, Y98W, Y102F, Y102W, Y103D, Y103E, Y103F, Y103H, Y103N, Y103Q, Y103W, L104F, L104H, L104M, L104V, L104Y, G105D, G105E, I106E y I106Y, en donde dicha sustitución proporciona una mayor unión a B7-1 y/o B7-2. En un caso preferente,

la inmunoadhesina CTLA4-Ig comprende una sustitución en CTLA4 seleccionada del grupo que consiste en A29H, T51N, M53Y, L61E y K93Q, en donde dicha sustitución proporciona una mayor unión a B7-1 y/o B7-2. En el caso de mayor preferencia, la inmunoadhesina CTLA4-Ig comprende una sustitución en CTLA4 seleccionada del grupo que consiste en A29H, T51N, L61E y K93Q, en donde dicha sustitución proporciona una mayor unión a B7-1 y/o B7-2. En otros casos, la inmunoadhesina CTLA4-Ig comprende una sustitución en CTLA4 seleccionada del grupo que consiste en A29H, A29K, T51N, L61E y Y103Q, en donde dicha sustitución proporciona una mayor unión a B7-1 y/o B7-2. En otros aspectos de la invención, la inmunoadhesina CTLA4-Ig comprende una sustitución CTLA4 seleccionada del grupo que consiste en K93V, L61Q y L104H, en donde dicha sustitución proporciona una mayor unión a B7-1 y/o B7-2.

En otro caso la inmunoadhesina CTLA4-Ig comprende una variante de la proteína CTLA4, en donde dicha variante comprende una combinación de sustituciones en CTLA4 seleccionadas del grupo que consiste en A29H/K93Q, A29H/M53Y, A29H/T51N, T51N/K93Q, T51N/M53Y, A29H/L61E/K93Q, A29H/M53Y/K93Q, A29H/M53Y/L61E, A29H/T51N/L61E, M53Y/L61 E/K93Q, T51N/L61E/K93Q, T51N/M53Y/L61E, A29H/M53Y/L61E/K93Q, A29H/T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N/M53Y/K93Q, A29H/T51N/M53Y/L61E, T51N/M53Y/L61E/K93Q y A29H/T51N/M53Y/L61E/K93Q, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1 y/o B7-2. En un caso preferente la inmunoadhesina CTLA4-Ig comprende una combinación de sustituciones en CTLA4 seleccionadas del grupo que consiste en T51N/L61E/K93Q y A29H/T51N/L61E/K93Q, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1 y/o B7-2. En otros casos la inmunoadhesina CTLA4-Ig comprende una combinación de sustituciones en CTLA4 seleccionadas del grupo que consiste en T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N, T51N/M53Y y T51N/M53Y/L61E, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1 y/o B7-2.

En otro caso, la inmunoadhesina CTLA4-Ig comprende una variante de la proteína CTLA4, en donde dicha variante comprende una sustitución en una posición de CTLA4 seleccionada del grupo que consiste en 35, 49, 51, 53, 59, 61 y 95, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1 y/o B7-2. En un caso preferente, la inmunoadhesina CTLA4-Ig comprende una variante de la proteína CLTA4, en donde dicha variante comprende una sustitución en una posición de CTLA4 seleccionada del grupo que consiste en 51 y 61, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1 y/o B7-2.

En un caso, la descripción proporciona inmunoadhesinas que comprenden un primer dominio que comprende una variante humana de CTLA4 y un segundo dominio que comprende una región Fc de IgG, en donde dicho primer dominio tiene la fórmula: Fx(1-28)-Vb(29)-Fx(30-50)-Vb(51)-Fx(52)-Vb(53)-Fx(54-60)-Vb(61)-Fx(62-92)-Vb(93)-Fx(94-124) [SEQ ID NO: 1], en donde Fx(1-28) es la secuencia MHVAQPAVLASSRGIASFVCEYASPGK (posiciones 1-28 de SEQ ID NO: 1); Vb(29) se selecciona del grupo que consiste en A y H; Fx(30-50) es la secuencia TEVRVTVLRQADSQVTEVCAA (posiciones 30-50 de SEQ ID NO: 1); Vb(51) es seleccionada del grupo que consiste en T y N; Fx(52) es Y; Vb(53) se selecciona del grupo que consiste en M y Y; Fx(54-60) es la secuencia MGNELTF (posiciones 54-60 de SEQ ID NO: 1); Vb(61) se selecciona del grupo que consiste en L y E; Fx(62-92) es la secuencia DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC (posiciones 62-92 de SEQ ID NO: 1); Vb(93) se selecciona del grupo que consiste en K y Q y Fx(94-124) es la secuencia VELMYPPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSD (posiciones 94-124 de SEQ ID NO: 1); en donde dicha variante comprende al menos una modificación de aminoácido en comparación con la SEQ ID NO:6 y en donde dicha variante exhibe una mayor unión a B7-1, B7-2 o ambos B7-1 y B7-2.

En un caso adicional la descripción proporciona inmunoadhesinas que comprenden un primer dominio que comprende una variante humana de CTLA4 y un segundo dominio que comprende una región Fc de IgG, en donde dicho primer dominio tiene la fórmula: Fx(1-28)-Vb(29)-Fx(30-50)-Vb(51)-Fx(52)-Vb(53)-Fx(54-60)-Vb(61)-Fx(62-92)-Vb(93)-Fx(94-124) [SEQ ID NO: 2] en donde Fx(1-28) es la secuencia MHVAQPAVLASSRGIASFVCEYASPGK (posiciones 1-28 de SEQ ID NO: 2); Vb(29) es H; Fx(30-50) es la secuencia TEVRVTVLRQADSQVTEVCAA (posiciones 30-50 de SEQ ID NO: 2); Vb(51) se selecciona del grupo que consiste en T y N; Fx(52) es Y; Vb(53) se selecciona del grupo que consiste en M y Y; Fx(54-60) es la secuencia MGNELTF (posiciones 54-60 de SEQ ID NO: 2); Vb(61) se selecciona del grupo que consiste en L y E; Fx(62-92) es la secuencia DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC (posiciones 62-92 de SEQ ID NO: 2); Vb(93) se selecciona del grupo que consiste en K y Q; y Fx(94-124) es la secuencia VELMYPPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSD (posiciones 94-124 de SEQ ID NO: 2); en donde dicha variante exhibe una mayor unión a B7-1, B7-2 o ambos B7-1 y B7-2.

En un caso adicional la descripción proporciona inmunoadhesinas que comprenden un primer dominio que comprende una variante humana de CTLA4 y un segundo dominio que comprende una región Fc de IgG, en donde dicho primer dominio tiene la fórmula: Fx(1-28)-Vb(29)-Fx(30-50)-Vb(51)-Fx(52)-Vb(53)-Fx(54-60)-Vb(61)-Fx(62-92)-Vb(93)-Fx(94-124) [SEQ ID NO: 3], en donde Fx(1-28) es la secuencia MHVAQPAVLASSRGIASFVCEYASPGK (posiciones 1-28 de SEQ ID NO: 3); Vb(29) se selecciona del grupo que consiste en A y H; Fx(30-50) es la secuencia TEVRVTVLRQADSQVTEVCAA (posiciones 30-50 de SEQ ID NO: 3); Vb(51) es N; Fx(52) es Y; Vb(53) se selecciona del grupo que consiste en M y Y; Fx(54-60) es la secuencia MGNELTF (posiciones 54-60 de SEQ ID NO: 3); Vb(61) se selecciona del grupo que consiste en L y E; Fx(62-92) es la secuencia DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC (posiciones 62-92 de SEQ ID NO: 3); Vb(93) se selecciona del grupo que consiste en K y Q; y Fx(94-124) es la secuencia VELMYPPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSD (posiciones 94-124 de SEQ ID NO: 3); en donde dicha variante exhibe una mayor unión a B7-1, B7-2 o ambos B7-1 y B7-2.

En un caso adicional la descripción proporciona inmunoadhesinas que comprenden un primer dominio que comprende una variante humana de CTLA4 y un segundo dominio que comprende una región Fc de IgG, en donde dicho primer dominio tiene la fórmula: Fx(1-28)-Vb(29)-Vb(30)-Vb(31)-Fx(32)-Vb(33)-Fx(34)-Vb(35)-Fx(36-48)-Vb(49)-Fx(50)-Vb(51)-Fx(52)-Vb(53)-Fx(54-58)-Vb(59)-Fx(60)-Vb(61)-Fx(62)-Vb(63)-Vb(64)-Fx(65-92)-Vb(93)-Fx(94)-Vb(95)-Fx(96)-Vb(97)-Vb(98)-Fx(99-101)-Vb(102)-Vb(103)-Vb(104)-Vb(105)-Vb(106)-Fx(107-124) [SEQ ID NO: 4]; en donde Fx(1-28) es la secuencia MHVAQPAVLASSRGIASFVCEYASPGK (posiciones 1-28 de SEQ ID NO: 4); Vb(29) se selecciona del grupo que consiste en A, E, F, H, K, N, Q y R; Vb(30) se selecciona del grupo que consiste en T, H y V; Vb(31) se selecciona del grupo que consiste en E, D, I, M, T y V; Fx(32) es V; Vb(33) se selecciona del grupo que consiste en R, E, F, I, L, M, Q, T, W y Y; Fx(34) es V; Vb(35)) se selecciona del grupo que

consiste en T, D, E, F, M, V y Y; Fx(36-48) es la secuencia VLRQADSQVTEVC (posiciones 36-48 de SEQ ID NO: 4); Vb(49) se selecciona del grupo que consiste en A, D, E, F, T, W y Y; Fx(50) es A; Vb(51) se selecciona del grupo que consiste en T, D, E, H, L, N, Q, R, S y V; Fx(52) es Y; Vb(53) se selecciona del grupo que consiste en M, E, F, H, Q, W y Y; Fx(54-58) es la secuencia MGNELT (posiciones 54-58 de SEQ ID NO: 4); Vb(59) se selecciona del grupo que consiste en T, H, I, L, N, Q, V y Y; Fx(60) es F; Vb(61) se selecciona del grupo que consiste en L, A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W y Y; Fx(62) es D; Vb(63) se selecciona del grupo que consiste en D y E; Vb(64) se selecciona del grupo que consiste en S, K, R y Y; Fx(65-92) es la secuencia ICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC (posiciones 65-92 de SEQ ID NO: 3); Vb(93) se selecciona del grupo que consiste en K, D, E, F, H, N, Q, R, S, T, V, W y Y; Fx(94) es V; Vb(95) se selecciona del grupo que consiste en E, D, H, L, Q y Y; Fx(96) es L; Vb(97) se selecciona del grupo que consiste en M, D, F, I, N y V; Vb(98) se selecciona del grupo que consiste en Y, F y W; Fx(99-101) es la secuencia PPP; Vb(102) se selecciona del grupo que consiste en Y, F y W; Vb(103) se selecciona del grupo que consiste en Y, D, E, F, H, N, Q y W; Vb(104) se selecciona del grupo que consiste en L, F, H, M, V y Y; Vb(105) es seleccionada del grupo que consiste en G, D y E; Vb(106) es seleccionada del grupo que consiste en I, E y Y; y Fx(107-124) se selecciona del grupo que consiste en GNGTQIYVIDPEPCPDSD (posiciones 107-124 de SEQ ID NO: 4), en donde dicha variante comprende al menos una modificación de aminoácido en comparación con la SEQ ID NO:6 y en donde dicha variante exhibe una mayor unión a B7-1, B7-2 o ambos B7-1 y B7-2.

En un caso adicional, la descripción proporciona inmunoadhesinas que comprenden la SEQ ID NO:8, en donde dicha inmunoadhesina comprende una modificación de aminoácido en comparación con la SEQ ID NO:6.

En un caso adicional, la descripción proporciona inmunoadhesinas que comprenden un primer dominio que comprende una variante de CTLA4 en comparación con la SEQ ID NO:6 y un segundo dominio que comprende una región Fc de IgG, en donde dicha variante de CTLA4 comprende una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en T51N, A29H, M53Y, L61E y K93Q, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1, B7-2, o ambos B7-1 y B7-2.

En un caso adicional, la descripción proporciona inmunoadhesinas que comprenden un primer dominio que comprende una variante de CTLA4 en comparación con la SEQ ID NO:6 y un segundo dominio que comprende una región Fc de IgG, en donde dicha variante de CTLA4 comprende una modificación de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en 51, 53, 61 y 93 usando el número de SEQ ID NO:6, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1, B7-2, o ambos B7-1 y B7-2.

En un caso, las inmunoadhesinas CTLA4-Ig comprenden una región Fc nativa. Las regiones Fc nativas preferentes de la descripción incluye, pero no se limita a las regiones Fc de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

En un caso preferente, las inmunoadhesinas CTLA4-Ig comprenden una región Fc variante. En un caso preferente, la región Fc variante aumenta la afinidad con el receptor Fc neonatal FcRn. En un caso de mayor preferencia, la región Fc de la variante extiende la vida media de CTLA4-Ig *in vivo*. Las variantes preferentes para aumentar la afinidad del FcRn y/o extender la vida media *in vivo* incluyen, pero no se limitan a 259I, 307Q, 308F, 311I, 311V, 378V, 378T, 426V, 428L, 434S, 436I, 436V, 250Q, 434A, 252Y, 254T y 256E, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU. Las variantes de mayor preferencia para aumentar la afinidad del FcRn y/o extender la vida media *in vivo* son la 428L y la 434S, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU.

La presente invención proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican las nuevas inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento. La presente invención proporciona vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, opcionalmente, unidos operativamente a secuencias de control. La presente invención proporciona células huésped que contienen los vectores, y métodos para la producción y, opcionalmente, la recuperación de las inmunoadhesinas.

La presente invención proporciona nuevas proteínas CTLA4-Ig. Dichas nuevas proteínas CTLA4-Ig pueden encontrar uso en un producto terapéutico.

La presente descripción proporciona composiciones que comprenden proteínas de CTLA4-Ig descritas en este documento, y un vehículo o diluyente fisiológicamente o farmacéuticamente aceptable.

La presente invención contempla los usos terapéuticos y de diagnóstico para las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento. Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig de la invención se usan preferiblemente para el tratamiento de un trastorno relacionado con la inmunidad. En las realizaciones más preferidas de la invención, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento se utilizan para tratar la enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, artritis psoriásica, psoriasis, artritis reumatoide, colitis ulcerosa y/o rechazo de trasplantes.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Las secuencias de aminoácidos de CTLA4 humano de longitud completa, el dominio extracelular (ECD) de CTLA4 humano y la versión variante de A29Y/L104E de belatacept de CTLA4 humano. El ECD de CTLA4 está resaltado en gris en la secuencia de longitud completa CTLA4. El gris en la secuencia de belatacept destaca las sustituciones A29Y/L104E [SEQ ID NO. 5-8].

Figura 2. Secuencias de aminoácidos de las regiones Fc ilustrativas. La región Fc en este documento se define como la posición 230 en el extremo C-terminal (230-447) basándose en el esquema de numeración de la UE. Los grises destacados indican las modificaciones de las regiones Fc de IgG nativa [SEQ ID NO. 9-15].

Figura 3. Secuencias de aminoácidos de enlazadores ejemplares. La numeración de los enlazadores se basa en el índice de la UE, y contiene los residuos 216-229, donde 216 es el N-terminal 216E de los cuatro isotipos de IgG nativos basándose en la numeración de la UE. La adición de la Q N-terminal no altera el número (es decir, 216E es todavía 216E). Los grises destacados indican las modificaciones de los enlazadores de IgG nativa [SEQ ID NO. 16-23].

Figura 4. Secuencias de aminoácidos de combinaciones ejemplares de enlazadores y regiones Fc utilizados en el presente estudio. Los grises destacados indican las modificaciones de secuencias de la región constante de IgG nativa [SEQ ID NO. 24-27].

Figura 5. Secuencias de aminoácidos de las inmunoadhesinas CTLA4-Ig seleccionadas estudiadas en el presente trabajo [SEQ ID NO. 28-30].

Figura 6. Representación del nivel de cambio (k_{off}) con relación a abatacept para todas las variantes de CTLA4-Ig de única sustitución seleccionada, representadas como triángulos grises. El cuadrado negro representa el abatacept CTLA4-Ig matriz, y el círculo vacío negro representa el belatacept.

Figura 7. Representación de la K_D de CD80 y CD86 para variantes CTLA4-Ig en comparación con abatacept y belatacept. Las variantes CTLA4-Ig del presente estudio se representan como triángulos grises. El cuadrado negro representa el abatacept CTLA4-Ig matriz, y el círculo vacío negro representa el belatacept.

Figura 8. Sensogramas de Biacore para la unión a CD86 (parte superior) y CD80 (parte inferior) al comparar con la variante de CTLA4-Ig HNEQ (A29H/T51N/L61E/K93Q) respecto a abatacept y belatacept.

Figura 9. Las secuencias de aminoácidos de la variante de CTLA4 ilustrativa y proteínas de la variante de CTLA4-Ig [SEQ ID NO. 31-34].

Figura 10. Actividad inhibidora de células T de variantes de CTLA4-Ig. Las células T se activan por coligación de CD3 utilizando un anticuerpo anti-CD3 y B7-2 utilizando B7-2-Ig recombinante. Se controlaron usando citometría de flujo las células T marcadas con CFSE.

Figura 11. Secuencias de aminoácidos de las variantes de CTLA4-Ig ilustrativas con variantes de Fc que extienden la semivida in vivo [SEQ ID NO. 35-38].

Figura 12. Sensogramas de Biacore para la unión a FcRn humano a pH 6,0 por versiones nativas y variantes de Fc de las proteínas CTLA4-Ig. LS se refiere a la variante de 428L/434S.

Figura 13. Representación de las afinidades de unión de FcRn (pH 6,0) de las versiones de Fc nativas y de Fc variante de las proteínas de CTLA4-Ig como se determina por Biacore. LS se refiere a la variante de 428L/434S.

Figura 14. Actividad inhibidora de células T de variantes de CTLA4-Ig. Las células T se activan mediante coligación de CD3 utilizando un anticuerpo anti-CD3 y B7-2 utilizando B7-2-Ig recombinante. Las células T marcadas con CFSE se controlaron usando citometría de flujo.

Figura 15. Actividad inhibitoria de células T de las variantes CTLA4-Ig en una reacción mixta de linfocitos. Las células T se activan por mezcla de PBMC alogénicas en dos series de experimentos (uno con los donantes 2336 y 3070 (arriba) y uno con los donantes 3070 y 3995 (abajo). La activación se cuantificó midiendo la liberación de IL-2, de acuerdo con el ELISA.

Figura 16. Actividad inhibidora de las proteínas de la variante de CTLA4-Ig in vivo. La capacidad de las proteínas de CTLA4-Ig para inhibir una respuesta inmunitaria humana al tétanos se llevó a cabo en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) injertados con leucocitos de sangre periférica humana (PBL). El gráfico muestra el nivel en suero de anticuerpos anti-tétanos (IgG anti-TT) después de la estimulación tetánica el día 21 post-injerto de PBL cuando son tratados con PBS (PBS + TT), abatacept, y la variante de CTLA4(NEQ)-Ig(ab) (51N/61E/93Q con afinidad mejorada para B7-1 y B7-2). PBS solo (sin tétanos) se llevó a cabo como un control negativo.

Descripción detallada de la invención

Visión de conjunto

- 5 La presente invención se refiere a nuevas inmunoadhesinas de la variante de CTLA4-Ig con mejores afinidades B7 y mejores actividades inhibitoras de las células T. Tales nuevas inmunoadhesinas son beneficiosas en una variedad de aplicaciones, tal como se analiza con detalle a continuación.

10 CTLA4 (linfocitos T citotóxicos antígeno 4), también denominado como CTLA-4 y también conocido como CD152 (grupo de diferenciación 152), es una proteína que juega un importante papel regulador en el sistema inmunológico. En los seres humanos, la proteína CTLA4 se codifica por el gen CTLA4, cuya secuencia de aminoácidos traducida se proporciona en SEQ ID NO: 5. CTLA4 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y es estructuralmente homóloga a la CD28, una proteína coestimuladora de las células T. CTLA4 se une a los ligandos coestimuladores B7-1 y B7-2 en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC). CTLA4 inhibe la respuesta inmunitaria en dos formas principales -compite con CD28 para su unión a B7-1 y B7-2 y, por lo tanto, bloquea la coestimulación, y reacciona negativamente para inhibir la activación de células T. Una región particularmente importante de la proteína CTLA4 para la presente invención es el dominio extracelular (ECD) (SEQ ID NO: 6), que media la unión a los ligandos B7-1 y B7-2 en las APC.

20 Como resultado de la función crítica de la vía B7 coestimuladora en la promoción y el mantenimiento de la respuesta inmunitaria, es deseable proporcionar agentes terapéuticos diseñados para antagonizar esta vía. En consecuencia, la presente invención proporciona las inmunoadhesiones de CTLA4-Ig.

Inmunoadhesinas CTLA4-Ig

25 La invención proporciona inmunoadhesinas CTLA4-Ig. El término "inmunoadhesina" se refiere a una proteína en la que uno o más polipéptidos está unido operativamente a una región Fc. La inmunoadhesina, tal como se usa en este documento, es sinónima de los términos "fusión Fc", "fusión Ig", "receptor fusión Fc", "Ig quimera", y la "globulina del receptor" (a veces con guiones) y "TRAP", como se usa en la técnica anterior (Chamow et al, 1996, Trends Biotechnol 14: 52-60; Ashkenazi et al, 1997, Curr Opin Immunol 9: 195-200). Una inmunoadhesina combina la región Fc de una inmunoglobulina con un compañero de fusión, que en general puede ser cualquier proteína o molécula pequeña que tiene especificidad para una proteína diana. Por lo tanto, las inmunoadhesinas tienen dos partes principales: una porción de unión a la diana y una porción Fc. La porción de unión a la diana puede tener especificidad para virtualmente cualquier antígeno diana u objetivo. La porción Fc puede unirse a uno o más receptores Fc o ligandos Fc. Las parejas de fusión pueden estar unidas a cualquier región de una región Fc, incluyendo en los extremos N- o C-terminales, o en algún residuo en medio de los extremos. Aunque prácticamente cualquier proteína o molécula pequeña pueda estar unida a Fc para generar una fusión Fc y, por lo tanto, para reconocer prácticamente cualquier objetivo, las inmunoadhesinas de la presente invención comprenden una CTLA4 o una variante de CTLA4 como compañero de fusión. La fusión de CTLA4 con una región Fc de Ig se denomina en este documento como CTLA4-Ig o proteína CTLA4-Ig.

Variantes CTLA4

45 La porción de unión a diana o pareja de fusión de las inmunoadhesinas de la invención se compone de la proteína CTLA4. Así, las inmunoadhesinas de la invención se dirigen a unirse con B7-1, B7-2, y cualesquiera otros ligandos o receptores, conocidos o desconocidos, que están unidos por CTLA4. La porción de unión a la diana de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos que se compone de todos, cualesquiera, o parte de la proteína CTLA4 humana (SEQ ID NO: 5). Preferiblemente, la porción de unión a inmunoadhesina comprende toda o parte de la ECD de CTLA4 (SEQ ID NO: 6). Como se describe en los ejemplos, la unión de la inmunoadhesina es preferiblemente una variante de CTLA4 que mejora la unión a B7-1, B7-2, o a ambos B7-1 y B7-2 y que, en algunos casos, muestra una unión preferencial a una o la otra.

Las variantes de CTLA4 comprenden al menos una modificación de aminoácido en una proteína CTLA4 nativa, por lo general, la proteína CTLA4 humana representada en la SEQ ID NO: 5, y en la mayoría de los casos las variantes se encuentran dentro del dominio extracelular ya que toda la proteína CTLA4 generalmente no se usa en las proteínas de fusión de la invención. En esta realización, se realizan una o más modificaciones en una o más de las siguientes posiciones (numeración como en la SEQ ID NO: 6): 29, 30, 31, 33, 35, 49, 51, 53, 59, 61, 63, 64, 93, 95, 97, 98, 102, 103, 104, 105 o 106. En algunas realizaciones, la modificación es una o más de las siguientes sustituciones: A29E, A29F, A29H, A29K, A29N, A29Q, A29R, T30E, T30H, T30R, T30V, E31D, E31I, E31M, E31T, E31V, R33E, R33F, R33I, R33L, R33M, R33Q, R33T, R33W, R33Y, T35D, T35E, T35F, T35M, T35V, T35Y, A49D, A49E, A49F, A49T, A49W, A49Y, T51D, T51E, T51H, T51L, T51N, T51Q, T51R, T51S, T51V, M53E, M53F, M53H, M53Q, M53W, M53Y, T59H, T59I, T59L, T59N, T59Q, T59V, T59Y, L61A, L61D, L61E, L61F, L61G, L61H, L61I, L61K, L61M, L61N, L61P, L61Q, L61R, L61S, L61T, L61V, L61W, L61Y, D63E, S64K, S64R, S64Y, K93D, K93E, K93F, K93H, K93N, K93Q, K93R, K93S, K93T, K93V, K93W, K93Y, E95D, E95H, E95L, E95Q, E95Y, M97D, M97F, M97I, M97N, M97V, Y98F, Y98W, Y102F, Y102W, Y103D, Y103E, Y103F, Y103H, Y103I, Y103J, Y103K, Y103L, Y103M, Y103N, Y103O, Y103P, Y103Q, Y103R, Y103S, Y103T, Y103U, Y103V, Y103W, Y103X, Y103Y, Y103Z, G105D, G105E, G105F, G105H, G105I, G105J, G105K, G105L, G105M, G105N, G105O, G105P, G105Q, G105R, G105S, G105T, G105U, G105V, G105W, G105X, G105Y, G105Z, I106E, I106F, I106G, I106H, I106I, I106J, I106K, I106L, I106M, I106N, I106O, I106P, I106Q, I106R, I106S, I106T, I106U, I106V, I106W, I106X, I106Y, I106Z. De uso particular en algunas realizaciones son las

variantes de CTLA4 que tienen una o más sustituciones seleccionadas de A29H, T51N, M53Y, L61E, y K93Q con combinaciones de uso particular incluyendo A29H/K93Q, A29H/M53Y, A29H/T51N, T51N/K93Q, T51N/M53Y, A29H/L61E/K93Q, A29H/M53Y/K93Q, A29H/M53Y/L61E, A29H/T51N/L61E, M53Y/L61E/K93Q, T51 N/L61E/K93Q, T51 N/M53Y/L61E, A29H/M53Y/L61E/K93Q, A29H/T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N/M53Y/K93Q, A29H/T51N/M53Y/L61E, T51N/M53Y/L61E/K93Q, y A29H/T51N/M53Y/L61E/K93Q.

En cuanto a todas las listas de las posiciones y sustituciones del presente documento, debe entenderse que se pueden hacer combinaciones de sustituciones individuales, de cualquiera y de todas las combinaciones posibles, y que cualquier posición individual o sustitución pueden ser incluidas o excluidas de la lista de posibilidades de forma independiente. En general, en comparación con el CTLA4 de tipo salvaje o matriz (o región Fc), en general, las variantes de la invención tienen 1, 2, 3, 4 ó 5 sustituciones de aminoácidos en la región de CTLA4, aunque en algunos casos se pueden utilizar más sustituciones, siempre y cuando se conserve la función deseada. Del mismo modo, como se describe a continuación, el dominio Fc puede tener sustituciones de esta manera también.

Como se describe en otro lugar, las variantes de CTLA4 generalmente preservan o mejoran la unión a uno o más de los ligandos de CTLA4, tal como la unión mejorada con B7-1 y/o B7-2.

Dominios Fc

La porción Fc de las inmunoadhesinas de la invención se compone de la región Fc o de alguna porción de la región Fc de un anticuerpo. Los anticuerpos son inmunoglobulinas que se unen a un antígeno específico. En la mayoría de los mamíferos, incluyendo los seres humanos y los ratones, los anticuerpos se construyen a partir de cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras emparejadas. Las regiones de cadena ligera y pesada variable muestran la diversidad de secuencia significativa entre los anticuerpos y son responsables de la unión al antígeno diana. Cada cadena se compone de dominios de inmunoglobulina (Ig) individuales y, por lo tanto, el término genérico inmunoglobulina se utiliza para tales proteínas.

Las unidades estructurales de anticuerpos naturales tradicionales típicamente comprenden un tetrámero. Cada tetrámero se compone típicamente de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (que tiene típicamente un peso molecular de aproximadamente 50-70 kDa). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. La IgG tiene varias subclases, incluyendo, pero no limitado a IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. La IgM tiene subclases, incluyendo, pero no limitado a, IgM1 y IgM2. La IgA tiene varias subclases, incluyendo, pero no limitado a IgA1 y IgA2. Por lo tanto, "isotipo", tal como se utiliza en este documento, se entiende como cualquiera de las clases y subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Los isotipos de inmunoglobulinas humanas conocidas son IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, e IgE. Las características distintivas entre estas clases de anticuerpos son sus regiones constantes, aunque pueden existir diferencias sutiles en la región variable.

Cada una de las cadenas ligera y pesada se compone de dos regiones distintas, denominadas las regiones variable y constante. La cadena pesada de IgG se compone de cuatro dominios de inmunoglobulina unidos desde el extremo N- al C-terminal en el orden VH-CH1-CH2-CH3, en referencia al dominio variable de cadena pesada, el dominio constante de la cadena pesada 1, el dominio constante de la cadena pesada 2, y el dominio constante de la cadena pesada 3, respectivamente (también denominado VH-Cy1-Cy2-Cy3, en referencia al dominio variable de la cadena pesada, dominio de gamma constante 1, dominio de gamma constante 2 y dominio de gamma constante 3, respectivamente). La cadena ligera de IgG se compone de dos dominios de inmunoglobulina unidos desde el extremo N- al C-terminal en el orden VL-CL, en referencia al dominio variable de cadena ligera y el dominio constante de la cadena ligera, respectivamente. Las regiones constantes muestran menos diversidad de secuencias y son responsables de la unión de un número de proteínas naturales que provocan importantes eventos bioquímicos. La estructura que constituye la forma biológica natural de un anticuerpo, incluyendo las regiones variables y constantes, se denomina en este documento "anticuerpo de longitud completa". En la mayoría de los mamíferos, incluyendo los seres humanos y los ratones, el anticuerpo de longitud completa del isotipo IgG es un tetrámero y consta de dos pares idénticos de dos cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y pesada, comprendiendo cada cadena ligera dominios de inmunoglobulina VL y CL, y comprendiendo cada cadena pesada dominios de inmunoglobulina VH, Cy1, Cy2 y Cy3.

La región variable, por lo general la porción amino-terminal de un anticuerpo, contiene los determinantes de unión a antígeno de la molécula y, por lo tanto, determina la especificidad de un anticuerpo por su antígeno diana. La región variable se llama así porque es el más distinto en secuencia a partir de otros anticuerpos de la misma clase.

La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. En la subclase IgG de inmunoglobulinas, hay varios dominios de inmunoglobulina de la cadena pesada denominados regiones constantes pesadas (CH). En el contexto de los anticuerpos IgG, los isotipos de IgG tienen cada uno tres regiones CH. En consecuencia, los dominios "CH" en el contexto de IgG son los siguientes: "CH1" se refiere a las posiciones 118-220 de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat. "CH2" se refiere a las posiciones

237-340 de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat, y "CH3" se refiere a las posiciones 341-447 de acuerdo con el índice de la UE como en Kabat.

Otra región importante de la cadena pesada es la región bisagra. Por "bisagra" o "región bisagra" o "región bisagra del anticuerpo" o "región de bisagra de inmunoglobulina" en este documento se entiende el polipéptido flexible que comprende los aminoácidos entre el primer y segundo dominios constantes de un anticuerpo. Estructuralmente, el dominio CH1 de IgG termina en la posición de UE 220, y el dominio CH2 de IgG comienza en el residuo 237 de la posición de UE. Por lo tanto, para la IgG de la bisagra del anticuerpo se define en este documento que incluye las posiciones de 221 (D221 en IgG1) a 236 (G236 en IgG1), en el que la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat. En algunas realizaciones, por ejemplo, en el contexto de una región Fc, se incluye la bisagra inferior, refiriéndose la "bisagra inferior" generalmente a las posiciones de 226 o 230 a 236.

Para todas las posiciones de la región constante discutidas en la presente invención, la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat (Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ta Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda). Los expertos en la técnica de los anticuerpos apreciarán que estas convenciones constan de una numeración no secuencial en regiones específicas de una secuencia de inmunoglobulina, lo que permite una referencia normalizada a las posiciones conservadas en las familias de la inmunoglobulina. En consecuencia, las posiciones de cualquier inmunoglobulina dada, como se define por el índice de UE, no se corresponde necesariamente con su secuencia secuencial.

Las inmunoadhesinas de la invención son proteínas que son fusiones de CTLA4 con la región Fc de un anticuerpo. Por "Fc" o "región Fc", como se usa en este documento, se entiende el polipéptido que comprende la región constante de un anticuerpo con exclusión del primer dominio de inmunoglobulina de la región constante y en algunos casos, parte de la bisagra. Así, Fc se refiere a los dos últimos dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgA, IgD e IgG, y los últimos tres dominios de inmunoglobulina de la región constante de IgE e IgM, y el extremo N-terminal de bisagra flexible a estos dominios. Para IgA e IgM, Fc puede incluir la cadena J. Para IgG, Fc comprende dominios de inmunoglobulina Cgamma2 y Cgamma3 (Cy2 y Cy3) y la región bisagra inferior entre Cgamma1 (Cy1) y Cgamma2 (Cy2). Aunque los límites de la región Fc pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define para incluir residuos 230 al extremo C-terminal, en el que la numeración se basa en el esquema de numeración de UE. Fc puede referirse a esta región de forma aislada, o esta región en el contexto de un polipéptido Fc. Por "polipéptido Fc" como se usa en el presente documento se quiere decir un polipéptido que comprende toda o parte de una región Fc. Los polipéptidos Fc incluyen anticuerpos, fusiones de Fc, Fc aislados y fragmentos de Fc.

La región Fc de un anticuerpo interactúa con un número de receptores y ligandos Fc, impartiendo una serie de capacidades funcionales importantes que denominadas funciones efectoras. Para la IgG de la región Fc, Fc comprende los dominios Ig y Cy2 Cy3 y la bisagra N-terminal que conduce a Cy2. Una importante familia de receptores de Fc para la clase IgG son los receptores de Fc gamma (FcγR). Estos receptores median en la comunicación entre los anticuerpos y el brazo celular del sistema inmunológico (Raghavan et al, 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220; Ravetch et al, 2001, *Annu Rev Immunol* 19: 275-290). En los seres humanos, esta familia de proteínas incluye FcγRI (CD64), incluyendo las isoformas FcγRIa, FcγRIb y FcγRIc; FcγRII (CD32), incluyendo las isoformas de FcγRIIA (incluyendo los alotipos H131 y R131), FcγRIIb (incluyendo FcγRIIb-1 y FcγRIIb-2), y FcγRIIc; y FcγRIII (CD16), incluyendo las isoformas de FcγRIIIa (incluyendo los alotipos V158 y F158) y FcγRIIIb (incluyendo los alotipos FcγRIIIb-NA1 y NA2-FcγRIIIb) (Jefferis et al, 2002, *Immunol Lett.* 82: 57-65).

Estos receptores tienen típicamente un dominio extracelular que media la unión a Fc, una región que atraviesa la membrana, y un dominio intracelular que puede mediar algún acontecimiento de señalización dentro de la célula. Estos receptores se expresan en una variedad de células inmunitarias, incluyendo monocitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, eosinófilos, mastocitos, plaquetas, células B, linfocitos grandes granulares, células de Langerhans, células asesinas naturales (NK) y células T γδ. La formación de los complejos Fc/FcγR reagrupa estas células efectoras en sitios de antígeno unido, por lo general resultando en eventos de señalización dentro de las células y las importantes respuestas inmunitarias posteriores, tales como la liberación de mediadores de la inflamación, la activación de las células B, endocitosis, fagocitosis y el ataque citotóxico. La capacidad para mediar las funciones efectoras citotóxicas y fagocíticas es un posible mecanismo por el que los anticuerpos destruyen las células diana. La reacción mediada por células en la que las células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana se conoce como citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células (ADCC) (Raghavan et al., 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 181-220; Ghetie et al, 2000, *Annu Rev Immunol* 18: 739-766; Ravetch et al, 2001, *Annu Rev Immunol* 19: 275-290).

La reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan FcγR reconocen el anticuerpo unido en una célula diana y posteriormente causan la fagocitosis de la célula diana se refiere como la fagocitosis mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCP).

Las diferentes subclases de IgG tienen diferentes afinidades por los FcγR, siendo la unión de IgG1 y IgG3 normalmente sustancialmente mejor a los receptores que a IgG2 y IgG4 (Jefferis et al, 2002, *Immunol Lett.* 82: 57-

65). Los FcγR se unen a la región Fc de IgG con diferentes afinidades. Los dominios extracelulares de FcγRIIIa y FcγRIIIb son 96% idénticos; sin embargo, FcγRIIIb no tiene un dominio de señalización intracelular. Además, mientras que FcγRI, FcγRIIA/c, y FcγRIIIa son reguladores positivos de la activación activada por complejo inmunitario, caracterizada por tener un dominio intracelular que tiene motivo de activación basado en tirosina del inmunorreceptor (ITAM), FcγRIIb tiene un motivo de inhibición basado en tirosina del inmunorreceptor (ITIM) y es, por lo tanto, inhibitorio. Así, a los primeros se conocen como receptores de activación, y FcγRIIb se conoce como un receptor de inhibidor. A pesar de estas diferencias en las afinidades y las actividades, todos los FcγR se unen a la misma región en Fc, en el extremo N-terminal del dominio Cγ2 y la bisagra anterior.

Un sitio de superposición, pero separado, de Fc sirve como interfaz para la proteína del complemento C1q. De la misma manera que la unión de Fc/FcγR media ADCC, la unión de Fc/C1q media la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Un sitio en Fc entre los dominios Cγ2 y Cγ3 media la interacción con el receptor neonatal FcRn, la unión del anticuerpo que recicla, que ha sufrido endocitosis, desde el endosoma de nuevo a la corriente sanguínea (Raghavan et al, 1996, *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12: 181-220; Ghetie et al, 2000, *Annu Rev Immunol* 18: 739-766).

Este proceso, junto con la exclusión de la filtración del riñón debido al gran tamaño de la molécula de longitud completa, da como resultado vidas medias en suero de anticuerpos favorables que van de una a tres semanas. La unión de Fc a FcRn también juega un papel clave en el transporte de anticuerpos. El sitio de unión para FcRn en Fc es también el sitio en el que las proteínas bacterianas A y G se unen. La unión fuerte por estas proteínas es típicamente explotada como un medio para purificar anticuerpos mediante el empleo de la proteína A o cromatografía de afinidad de proteína G durante la purificación de proteínas. La fidelidad de estas regiones, el complemento y las regiones de unión FcRn/proteína A son importantes tanto para las propiedades clínicas de los anticuerpos como para su desarrollo.

Una característica clave de la región Fc es la glicosilación ligada a N conservada que se produce en N297. Este carbohidrato, u oligosacárido como a veces se hace referencia, juega un papel estructural y funcional crítico para el anticuerpo, y es una de las razones principales de que los anticuerpos deban ser elaborados a través de sistemas de expresión de mamíferos. La unión eficiente a FcγR y C1q requiere esta modificación, y las alteraciones en la composición de los hidratos de carbono N297 o su eliminación afectan a la unión a estas proteínas.

Las inmunoglobulinas de las realizaciones descritas en este documento pueden ser codificadas sustancialmente por genes de inmunoglobulina que pertenecen a cualquiera de las clases de anticuerpos. En ciertas realizaciones, las inmunoglobulinas descritas en este documento comprenden secuencias que pertenecen a la clase IgG de anticuerpos, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En realizaciones alternativas, las inmunoglobulinas descritas en este documento comprenden secuencias que pertenecen a las clases de anticuerpos IgA (incluyendo las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG o IgM. Las inmunoglobulinas descritas en este documento pueden comprender más de una cadena de proteína, por ejemplo, puede ser un anticuerpo o fusión Fc que es un monómero o un oligómero, que incluye un homo- o hetero-oligómero.

Las inmunoglobulinas descritas en este documento pueden ser codificadas sustancialmente por genes de cualquier organismo, por ejemplo, mamíferos (incluyendo, pero no limitado a seres humanos, roedores (incluyendo pero no limitado a ratones y ratas), Lagomorpha (incluyendo pero no limitado a conejos y liebres), camélidos (incluyendo, pero no limitado a los camellos, llamas y dromedarios) y primates no humanos, incluyendo pero no limitado a prosimios, Platyrrhini (monos del Nuevo mundo), Cercopithecoidea (monos del viejo mundo), y Hominoidea incluyendo el Gibbons y Grandes y menores simios. En las realizaciones más preferidas, las inmunoglobulinas descritas en este documento pueden ser sustancialmente humanas.

Como es bien conocido en la técnica, existen polimorfismos de inmunoglobulina en la población humana. El polimorfismo Gm se determina por los genes IGHG1, IGHG2 y IGHG3 que tienen alelos que codifican determinantes antigénicos alotípicos referidos como alotipos G1m, G2m, y G3m para marcadores de las moléculas IgG1, IgG2 e IgG3 humanas (no se han encontrado alotipos Gm en la cadena gamma 4). Los marcadores se pueden clasificar en 'alotipos' e "isoalotipos". Estos se distinguen por diferentes bases serológicas dependiendo de las fuertes homologías de secuencia entre los isotipos. Los alotipos son determinantes antigénicos especificados por formas alélicas de los genes de Ig. Los alotipos representan ligeras diferencias en las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas o ligeras de diferentes individuos. Incluso una sola diferencia de aminoácido puede dar lugar a un determinante alotípico, aunque en muchos casos haya varias sustituciones de aminoácidos que se hayan producido. Los alotipos son las diferencias de secuencia entre los alelos de una subclase con lo que los antisueros reconocen sólo las diferencias alélicas. Un isoalotipo es un alelo en un isotipo que produce un epítipo que se comparte con una región homóloga no polimórfica de uno o más de otros isotipos y debido a esto los antisueros reaccionarán tanto con los alotipos pertinentes como con los isotipos homólogos pertinentes (Clark, 1997, *IgG effector mechanisms*, *Chem Immunol.* 65:88-110; Gorman & Clark, 1990, *Semin Immunol* 2 (6): 457-66).

Las formas alélicas de las inmunoglobulinas humanas han sido bien caracterizadas (WHO Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. *J Immunogen* 1976, 3: 357-362; WHO Review of the

notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. 1976, EUR. J. Immunol. 6, 599-601; Loghem E van, 1986, Allotypic markers, Monogr Allergy 19: 40-51).

Además, se han caracterizado otros polimorfismos (Kim et al., 2001, J. Mol. Evol. 54: 1-9). En la actualidad, se conocen 18 alotipos GM: G1M (1, 2, 3, 17) o G1M (a, x, f, z), G2m (23) o G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) o G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, G1, c5, u, v, g5) (Lefranc, et al., The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199 a 211).

Los alotipos que se heredan en combinaciones fijas son llamados haplotipos Gm. Las inmunoglobulinas descritas en este documento pueden ser codificadas sustancialmente por cualquier alotipo, isoalotipo, o haplotipo de cualquier gen de inmunoglobulina.

Las proteínas de CTLA4 pueden estar unidas a las regiones Fc a través de un enlazador. El término "enlazador" se utiliza para indicar polipéptidos que comprenden dos o más residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y se utilizan para enlazar una o más porciones de unión a antígeno. Tales polipéptidos enlazadores son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123). Una variedad de enlazadores puede encontrar uso en algunas realizaciones descritas en el presente documento para unir covalentemente las regiones Fc a una pareja de fusión. "Enlazador" en el presente documento también se refiere a la "secuencia del enlazador", "espaciador", "secuencia de anclaje" o equivalentes gramaticales de los mismos. Los enlazadores homo- o heterobifuncionales son bien conocidos (véase, 1994 Catálogo de Pierce Chemical Company, sección técnica sobre agentes reticuladores, páginas 155-200, que se incorpora en su totalidad por referencia). Un número de estrategias pueden ser utilizadas para unir covalentemente moléculas. Estas incluyen, pero no se limitan a enlaces de polipéptidos entre extremos N- y C-terminales de las proteínas o de los dominios de proteínas, unión a través de enlaces disulfuro y enlace a través de reactivos de reticulación químicos. En un aspecto de esta realización, el enlazador es un enlace peptídico, generado mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. El péptido enlazador puede incluir predominantemente los siguientes residuos de aminoácidos: Gly, Ser, Ala, o Thr. El péptido enlazador debe tener una longitud que sea adecuada para unir dos moléculas de tal manera que asuman la conformación correcta con relación entre sí, de una manera tal que retengan la actividad deseada. En una realización, el enlazador tiene aproximadamente de 1 a 50 aminoácidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 1 a 30 aminoácidos de longitud. En una realización, se pueden utilizar enlazadores de 1 a 20 aminoácidos de longitud. Los enlazadores útiles incluyen polímeros de glicina-serina, incluyendo, por ejemplo, (GS)_n, (GSGGS)_n [SEQ ID NO: 39], (GGGGS)_n [SEQ ID NO: 40], y (GGGS)_n [SEQ ID NO: 41], donde n es un número entero de al menos uno, polímeros de glicina-alanina, polímeros de alanina-serina y otros enlazadores flexibles. Alternativamente, una variedad de polímeros no proteicos, incluyendo, pero no limitados a polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, pueden encontrar uso como enlazadores, es decir pueden encontrar uso como enlazadores.

Los enlazadores preferidos de la invención comprenden secuencias de una región bisagra del anticuerpo. Se pueden utilizar secuencias de las regiones bisagra de cualquier isotipo de anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, secuencias de bisagra de IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4. Las secuencias de enlazador también pueden incluir cualquier secuencia de cualquier longitud del dominio CL/CH1, pero no todos los residuos del dominio CL/CH1; por ejemplo, los primeros 5-12 residuos de aminoácidos de los dominios CL/CH1. Los enlazadores se pueden derivar de las cadenas pesadas de inmunoglobulina de cualquier isotipo, incluyendo por ejemplo Cy1, Cy2, Cy3, Cy4, Ca1, Ca2, Cδ, Cε y Cμ. Los enlazadores pueden derivarse de la cadena ligera de inmunoglobulina, por ejemplo, Cκ o Cλ. Pueden ser derivadas secuencias de enlazador también de otras proteínas tales como las proteínas similares a Ig (por ejemplo, TCR, FcR, KIR), secuencias derivadas de la región bisagra, y otras secuencias naturales de otras proteínas.

Modificaciones de aminoácidos en inmunoadhesinas CTLA4-Ig

Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden comprender una variante de CTLA4, una región Fc variante, o ambas una variante de CTLA4 y una región Fc variante. Una variante comprende una o más modificaciones de aminoácidos con relación a una proteína CTLA4-Ig matriz, en la que la modificación o las modificaciones de aminoácidos proporcionan una o más propiedades optimizadas. Por "modificación" en este documento se entiende una alteración en las propiedades físicas, químicas, o de secuencia de una proteína, polipéptido, anticuerpo, o inmunoadhesina CTLA4-Ig. Por "aminoácido" e "identidad de aminoácido", como se usa en el presente documento, se quiere decir uno de los 20 aminoácidos de origen natural o cualquier análogo no natural que pueda estar presente en una posición específica y definida. Por lo tanto, "aminoácido", como se utiliza en este documento, significa tanto, aminoácidos de origen natural como sintéticos. Por ejemplo, homofenilalanina, citrulina y norleucina se consideran aminoácidos para los propósitos de la invención. "Aminoácido" incluye también residuos de imino ácido tales como prolina e hidroxiprolina. La cadena lateral puede estar en la configuración (R) o en la configuración (S). En la realización preferida, los aminoácidos están en la configuración (S) o L. Si se utilizan cadenas laterales de origen no natural, se pueden utilizar sustituyentes que no son aminoácidos, por ejemplo, para prevenir o retardar la degradación in vivo. Una modificación de aminoácido puede ser una sustitución de aminoácido,

inserción y/o delección en una secuencia de polipéptido. Por "sustitución de aminoácido" o "sustitución" en el presente documento se entiende la sustitución de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido matriz con otro aminoácido. Por "inserción de aminoácido" o "inserción", como se usa en el presente documento, se entiende la adición de un aminoácido en una posición particular en una secuencia de polipéptido matriz. Por "delección de aminoácido" o "delección", como se usa en este documento, se entiende la eliminación de un aminoácido en una posición particular en una secuencia del polipéptido matriz.

Una variante descrita en este documento difiere en la secuencia de aminoácidos de su matriz en virtud de al menos una modificación de aminoácido. Por "polipéptido original", "proteína matriz", "polipéptido precursor", o "proteína precursora", tal como se usan en el presente documento, se quiere decir un polipéptido no modificado que se modifica posteriormente para generar una variante. Dicho polipéptido matriz puede ser un polipéptido de origen natural, es decir, un WT o proteína nativa, o una variante o versión modificada de un polipéptido de origen natural. El polipéptido matriz puede referirse al propio polipéptido, las composiciones que comprenden el polipéptido original, o la secuencia de aminoácidos que codifica. Por "tipo salvaje", "WT", o "nativo" en este documento se entiende una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que se encuentra en la naturaleza, incluyendo variaciones alélicas. Una proteína WT, incluyendo por ejemplo una proteína WT CTLA4 o de la región WT Fc, tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que no se ha modificado intencionadamente. Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden tener más de una modificación de aminoácido, en comparación con la matriz, por ejemplo, de aproximadamente una a cincuenta modificaciones de aminoácidos, por ejemplo, de aproximadamente una a diez modificaciones de aminoácidos, de aproximadamente una a aproximadamente cinco modificaciones de aminoácidos, etc., en comparación a la matriz. Por lo tanto, las secuencias de las variantes y las del polipéptido matriz son sustancialmente homólogas. Por ejemplo, las secuencias de la variante en el presente documento poseerán aproximadamente un 80% de homología con la secuencia matriz, por ejemplo, al menos aproximadamente 90% de homología, al menos aproximadamente 95% de homología, al menos aproximadamente 98% de homología, al menos aproximadamente 99% de homología, etc. Las modificaciones descritas en este documento también incluyen modificaciones de glicofomas. Se pueden hacer modificaciones genéticamente utilizando biología molecular, o se pueden hacer enzimáticamente o químicamente.

Las variantes descritas en este documento se definen de acuerdo con las modificaciones de aminoácidos que las componen. Así, por ejemplo, la sustitución T51N en CTLA4 se refiere a una variante de CTLA4 en la que la treonina en la posición 51 se sustituye con asparagina. Como otro ejemplo, la sustitución N434S en la región Fc se refiere a una variante de Fc en la que la asparagina en la posición 434 se sustituye con serina. Del mismo modo, M428L/N434S define una variante de Fc con las sustituciones M428L y N434S en relación con el polipéptido Fc matriz. La identidad del aminoácido WT puede ser no especificada, en cuyo caso la variante antes mencionada se refiere como 428L/434S. Se observa que el orden en que se proporcionan sustituciones es arbitrario; es decir, que, por ejemplo, 428L/434S es la misma variante Fc que 434S/428L. Para modificaciones en CTLA4, la numeración de las posiciones en el presente documento es según la numeración secuencial de la región extracelular de CTLA4 proporcionada en la SEQ ID NO: 6. Las posiciones de la región constante del anticuerpo y de la región Fc descritas en este documento están enumeradas de acuerdo con el índice de UE o el esquema de numeración de UE (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda).

El índice de UE o el índice de UE como en Kabat o el esquema de numeración de UE se refiere a la numeración del anticuerpo de UE (Edelman et al, 1969, Proc Natl Acad Sci USA 63: 78-85).

El objetivo de las variantes en el presente documento es proporcionar una o más propiedades optimizadas, por lo general mediante la alteración de la afinidad para un ligando diana o receptor de Fc. La afinidad puede potenciarse o reducirse en relación con una proteína de matriz. Por "mayor afinidad" o "mejor afinidad" o "afinidad mejorada" o "mejorada afinidad" de un polipéptido matriz, tal como se utiliza en este documento, se entiende que una variante se une a un ligando o receptor con una constante de equilibrio de asociación (KA o Ka) significativamente mayor o menor constante de equilibrio de disociación (KD o Kd) que el polipéptido matriz hecho en las mismas condiciones, por ejemplo, cuando las cantidades del polipéptido variante y original en el ensayo de unión son esencialmente las mismas.

Por ejemplo, una variante de CTLA4 con la mejora de la afinidad de unión de B7-2 puede mostrar de aproximadamente 1,2, 1,5, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 veces o más, la mejora en la afinidad de unión de B7-2 en comparación con el polipéptido CTLA4 matriz, donde se determina la afinidad de unión de B7-2, por ejemplo, por los métodos de unión descritos en este documento, incluyendo pero no limitados a Biacore™, por un experto en la técnica.

En consecuencia, por "afinidad reducida" en comparación con un polipéptido matriz como se usa en el presente documento se entiende que una variante se une a un ligando o receptor con KA significativamente más bajo o KD más alto que el polipéptido matriz. También puede definirse una mayor o menor afinidad en relación con un nivel absoluto de afinidad.

Las inmunoadhesinas comprenden en el presente documento preferiblemente una variante de CTLA4. Las variantes de CTLA4 pueden mejorar la unión a B7-1, B7-2, o ambos B7-1 y B7-2. Las variantes de CTLA4 pueden mejorar la unión selectivamente a B7-2 en relación con B7-1. Es decir, las variantes pueden mejorar la afinidad de CTLA4 para B7-2, aunque o bien pueden reducir la afinidad por B7-1, no afectar a la afinidad de B7-1, o mejorar la afinidad por B7-1 menos que la mejora de la afinidad a B7-2. Alternativamente, las variantes pueden mejorar la unión selectivamente a B7-1 en relación con B7-2.

Las inmunoadhesinas comprenden en el presente documento preferiblemente una variante de Fc. Las variantes de Fc descritas en el presente documento pueden optimizarse para mejorar o reducir la unión a receptores de Fc o ligandos de Fc. Por "receptor de Fc" o "ligando de Fc", como se usa en el presente documento, se entiende una molécula, preferiblemente un polipéptido, de cualquier organismo que se une a la región Fc de un anticuerpo para formar un complejo de Fc-ligando. Los ligandos Fc incluyen, pero no se limitan a, FcγRs, FcγRs, FcγRs, FcRn, C1q, C3, lectina de unión a la manosa, receptor de manosa, la proteína A estafilocócica, proteína G estreptocócica, y FcγR viral. Los ligandos Fc también incluyen homólogos de los receptores de Fc (FcRH), que son una familia de receptores de Fc que son homólogos a las FcγRs. Los ligandos Fc pueden incluir moléculas no descubiertas que se unen a Fc.

En realizaciones preferidas, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento incorporan variantes de Fc que mejoran la unión de FcRn. Tales variantes pueden mejorar las propiedades farmacocinéticas in vivo de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig. Las variantes preferidas que aumentan la unión a FcRn y/o mejoran las propiedades farmacocinéticas incluyen, pero no se limitan, a las sustituciones en las posiciones 259, 308, 428 y 434, incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, 259I, 308F, 428L, 428M, 434S, 434H, 434F, 434Y y 434M (USSN12/341.769, presentada el 22 de diciembre de 2008, titulada "Fc Variants with Altered Binding to FcRn").

Otras variantes que aumentan la unión de Fc a FcRn incluyen, pero no están limitados, a: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al, 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176: 346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 307Q, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al., Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 (9): 6591-6604), 252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, 308T/309P/311S (Dall'Acqua et al., Journal of Immunology, 2002, 169:5171-5180, Dall'Acqua et al., 2006, Journal of Biological Chemistry 281: 23514-23524). Otras modificaciones para modular la unión de FcRn se describen en Yeung et al, 2010, J. Immunol., 182: 7663-7671.

Otras modificaciones Fc para uso en la presente invención incluyen variantes que reducen o eliminan la unión a FcγRs y/o proteínas del complemento, reduciendo o eliminando así las funciones efectoras mediadas por Fc, tales como ADCC, ADCP y CDC. Dichas variantes también se denominan en este documento "variantes de desactivación génica" o "variantes KO". Las variantes que reducen la unión a FcγRs y el complemento son útiles para reducir las interacciones no deseadas mediadas por la región Fc y para el ajuste de la selectividad de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig. Las variantes de desactivación génica preferidas se describen en el documento US2008/0242845 A1, publicado el 2 de octubre de 2008 y titulado "Fc Variants with Optimized Properties". Las modificaciones preferidas incluyen, pero no están limitadas, a sustituciones, inserciones y deleciones en las posiciones 234, 235, 236, 237, 267, 269, 325 y 328, en el que la numeración es de acuerdo con el índice EU. Las sustituciones preferidas incluyen, pero no se limitan a 234G, 235G, 236R, 237K, 267R, 269R, 325L y 328R, en el que la numeración es de acuerdo con el índice EU. Una variante preferida comprende 236R/328R. Las variantes pueden ser utilizadas en el contexto de cualquier isotipo IgG o la región Fc del isotipo de IgG, incluyendo, pero no limitados, a IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4 humanas. Las regiones Fc de IgG preferidas para reducir FcγR y complementar la unión y la reducción de las funciones efectoras mediadas por Fc son regiones Fc de IgG2 e IgG4. También pueden ser útiles isotipos híbridos, por ejemplo, isotipos IgG1/IgG2 híbridos como se describe en USSN11/256.060. Otras modificaciones que reducen las interacciones de FcγR y el complemento incluyen, pero no se limitan, a sustituciones 297A, 234A, 235A, 237A, 318A, 228P, 236E, 268Q, 309L, 330S, 331S, 220S, 226S, 229S, 238S, 233P y 234V, así como la eliminación de la glicosilación en la posición 297 por medio de mutaciones o medios enzimáticos o mediante la producción en organismos tales como bacterias que no glicosilan las proteínas. Estas y otras modificaciones se revisan en Strohl, 2009, Current Opinion in Biotechnology 20: 685-691.

Las modificaciones Fc que mejoran la unión a FcγRs y/o al complemento también pueden encontrar el uso en las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig de este documento. Tales variantes de Fc pueden mejorar las funciones efectoras mediadas por Fc tales como ADCC, ADCP y/o CDC. Modificaciones preferidas para mejorar y complementar la unión de FcγR se describen en el documento US2006/0024298 A1, publicado el 2 de febrero de 2006, y el documento US2006/0235208 A1, publicado el 19 de octubre de 2006. Las modificaciones preferidas comprenden una sustitución en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en 236, 239, 268, 324 y 332, en el que la numeración es de acuerdo con el índice de UE. Las sustituciones preferidas incluyen, pero no se limitan, a 236A, 239D, 239E, 268D, 267E, 268E, 268F, 324T, 332D y 332E. Las variantes preferidas incluyen, pero no se limitan, a 239D/332E, 236A/332E, 236A/239D/332E, 268F/324T, 267E/268F, 267E/324T y 267E/268F/324T. Otras modificaciones para mejorar las interacciones de FcγR y el complemento incluyen, pero no se limitan, a sustituciones 298A, 333A, 334A, 326A, 2471, 339D, 339Q, 280H, 290S, 298D, 298V, 243L, 292P, 300L, 396L, 3051 y 396L. Estas y otras modificaciones se revisan en Strohl, 2009, ibid.

En una realización, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden incorporar variantes de Fc que aumentan la afinidad por un receptor inhibidor FcγRIIb. Tales variantes pueden proporcionar las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig en el presente documento con actividades inmunomoduladoras relacionadas con células FcγRIIb⁺, incluyendo, por ejemplo, células B y monocitos. En una realización, las variantes de Fc proporcionan una mayor afinidad selectiva respecto a FcγRIIb relativa a uno o más receptores activadores. Las modificaciones para alterar la unión a FcγRIIb se describen en el documento USSN 12/156183, presentado el 30 de mayo de 2008, titulado "Methods and Compositions for Inhibiting CD32b Expressing Cells", incorporado expresamente por referencia. En particular, las variantes de Fc que mejoran la unión a FcγRIIb pueden incluir una o más modificaciones en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en 234, 235, 236, 237, 239, 266, 267, 268, 325, 326, 327, 328 y 332, de acuerdo con el índice de UE. Sustituciones preferibles para mejorar la afinidad de FcγRIIb incluyen, pero no se limitan, a 234D, 234E, 234W, 235D, 235F, 235R, 235Y, 236D, 236N, 237D, 237N, 239D, 239E, 266M, 267D, 267E, 268D, 268E, 327D, 327E, 328F, 328W, 328Y, y 332E. Más preferiblemente, las sustituciones incluyen, pero no se limitan, a 235Y, 236D, 239D, 266M, 267E, 268D, 268E, 328F, 328W y 328Y. Variantes Fc preferidas para mejorar la unión a FcγRIIb incluyen, pero no se limitan, a 235Y/267E, 236D/267E, 239D/268D, 239D/267E, 267E/268D, 267E/268E y 267E/328F.

Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden incorporar modificaciones Fc en el contexto de cualquier isotipo IgG o región Fc del isotipo de IgG, incluyendo, pero no limitado, a IgG1, IgG2, IgG3 y/o IgG4 humana. EL isotipo IgG puede seleccionarse tal como para alterar la función o funciones efectoras mediadas por FcγR y/o complemento. También pueden ser útiles isotipos de IgG híbridos. Por ejemplo, el documento USSN 11/256060 describe una serie de regiones constantes de IgG1/IgG2 híbridas que pueden encontrar uso en la invención en particular. En algunas realizaciones de la invención, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig pueden comprender medios para modificaciones isotípicas, es decir, las modificaciones en una IgG matriz para el tipo de aminoácidos en una IgG alternativa. Por ejemplo, una variante híbrida de IgG1/IgG3 puede ser construida por un medio de sustitución sustituyendo las posiciones de IgG1 en la región CH2 y/o CH3 con los aminoácidos de IgG3 en las posiciones donde los dos isotipos difieren. Así, un anticuerpo de IgG variante híbrido puede ser construido de manera que comprenda uno o más medios de sustitución, por ejemplo, 274Q, 276K, 300F, 339T, 356E, 358M, 384S, 392N, 397M, 422I, 435R y 436F. En otras realizaciones de la invención, una variante híbrida de IgG1/IgG2 puede ser construida por un medio de sustitución para la sustitución de las posiciones de IgG2 en la región CH2 y/o CH3 con aminoácidos de IgG1 en las posiciones donde los dos isotipos difieren. Así, un anticuerpo de IgG variante híbrido puede ser construido de manera que comprenda uno o más medios sustitutivos, por ejemplo, uno o más de las siguientes subestaciones de aminoácidos: 233E, 234L, 235L, -236G (en referencia a una inserción de una glicina en la posición 236), y 327A.

Como se apreciará por los expertos en la técnica, la descripción de las variantes individuales y de combinación en la región Fc puede ser independiente y opcionalmente combinado con cualquiera de las variantes de CTLA4 descritas en este documento. Es decir, como se describe en el presente documento, las variantes de CTLA4 se seleccionan individualmente y, opcionalmente, y/o son combinadas dentro del conjunto de las variantes descritas, en cualquier combinación. Del mismo modo, las listas anteriores de las variantes del dominio Fc adecuadas pueden ser individualmente y, opcionalmente, combinadas de cualquier manera, no sólo dentro de la región Fc, sino con las variantes de CTLA4. Es decir, una variante de CTLA4 puede ser seleccionada para que comprenda un número de variantes, por ejemplo, A29H/T51N/L61E/K93Q, y estas variantes pueden combinarse con las variantes de dominio de Fc, tales como 239D/332E, y/o 428L/434S. Por lo tanto, la descripción de una "lista" de posibles variantes individuales se entiende que incluye cualquiera y todas las combinaciones posibles dentro de la lista, así como con otras listas de variantes de las mismas o para otros fines.

Modificaciones de la glicoforma

Las regiones Fc del anticuerpo contienen hidratos de carbono en las posiciones conservadas en las regiones constantes de la cadena pesada. Cada isotipo de anticuerpo tiene una distinta variedad de estructuras de carbohidratos N-ligados. Aparte del carbohidrato unido a la cadena pesada, hasta 30% de las IgG humanas tienen una región Fab glicosilada. IgG tiene un único hidrato de carbono biantenarío ligado a N en Asn297 del dominio CH2. Para IgG de suero o producido ex vivo en hibridomas o células modificadas, las IgG son heterogéneas con respecto a los hidratos de carbono unidos a Asn297. Para la IgG humana, el oligosacárido de núcleo consiste normalmente en GlcNAc2Man3GlcNAc con números de residuos exteriores diferentes.

Los restos de carbohidratos de las inmunoadhesinas descritas en el presente documento se describirán con referencia a la nomenclatura usada comúnmente para la descripción de los oligosacáridos. Una revisión de la química de carbohidratos que utiliza esta nomenclatura se encuentra en Hubbard et al. 1981, Ann. Rev. Biochem. 50: 555-583. Esta nomenclatura incluye, por ejemplo, Man, que representa manosa; GlcNAc, que representa 2-N-acetilglucosamina; Gal que representa galactosa; Fuc para fucosa; y Glc, que representa glucosa. Los ácidos siálicos se describen por la notación abreviada NeuNAc, para el ácido 5-N-acetilneuramínico, y NeuNgc para 5-glicolilneuramínico.

El término "glicosilación" significa la unión de oligosacáridos (hidratos de carbono que contienen dos o más azúcares simples unidos entre sí, por ejemplo, de dos a aproximadamente doce azúcares simples unidos) a una glicoproteína. Las cadenas laterales de oligosacáridos están típicamente unidas a la cadena principal de la glicoproteína a través de cualquiera de los enlaces N- u O-. Los oligosacáridos de inmunoadhesinas descritos en la presente que tienen lugar generalmente se unen a un dominio CH2 de una región Fc como oligosacáridos unidos a N. "Glicosilación N-ligada" se refiere a la unión del resto carbohidrato a un residuo de asparagina en una cadena de glicoproteína. El experto en la técnica reconocerá que, por ejemplo, cada una de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 murina, así como los dominios CH2 de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgD humana tienen un solo sitio para la glicosilación ligada a N en el residuo 297.

A los efectos del presente documento, una "estructura de carbohidrato central madura" se refiere a una estructura de carbohidrato central procesada unida a una región Fc que generalmente consta de la siguiente estructura de carbohidrato GlcNAc(fucosa)-GlcNAc-Man-(Man-GlcNAc)₂ típica de oligosacáridos biantenarios. La estructura de núcleo de hidratos de carbono madura se une a la región Fc de la glicoproteína, generalmente a través de la unión N- a Asn297 de un dominio CH2 de la región Fc. Un "GlcNAc de bisección" es un residuo de GlcNAc unido a la manosa α 1,4 de la estructura del núcleo de hidratos de carbono madura. La GlcNAc de bisección puede unirse enzimáticamente a la estructura de núcleo de hidrato de carbono madura por una enzima α (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII). Las células CHO normalmente no expresan GnTIII (Stanley et al., 1984, J. Biol. Chem. 261: 13.370-13.378), pero pueden ser diseñadas para hacerlo (Umana et al, 1999, Nature Biotech. 17: 176-180).

Se describen en el presente documento inmunoadhesinas CTLA4-Ig que componen glicoformas o glicoformas modificados por ingeniería. Por "glicoforma modificada" o "glicoforma modificada por ingeniería", como se utiliza en este documento, se entiende una composición de hidratos de carbono que está unida covalentemente a una proteína, por ejemplo, a un anticuerpo, en el que dicha composición de carbohidrato difiere químicamente de la de una proteína de matriz. Las glicoformas de ingeniería pueden ser útiles para una variedad de propósitos, incluyendo, pero no limitados a aumentar o reducir la función efectora mediada por Fc γ R. En una realización, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento son modificadas para controlar el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o de bisección que se unen covalentemente a la región Fc.

Una variedad de métodos es bien conocida en la técnica para generar glicoformas modificadas (Umaña et al, 1999, Nat Biotechnol 17: 176-180; Davies et al, 2001, Biotechnol Bioeng 74: 288-294; Shields et al, 2002, J Biol Chem 277: 26.733 a 26.740; Shinkawa et al, 2003, J Biol Chem 278: 3.466-3.473, documento USSN 12/434,533).

Estas técnicas controlan el nivel de oligosacáridos fucosilados y/o de bisección que se unen covalentemente a la región Fc, por ejemplo mediante la expresión de una IgG en diversos organismos o líneas celulares, de ingeniería o de otro modo (por ejemplo células Lec-13 CHO o células de hibridoma de rata YB2/O), mediante la regulación de las enzimas implicadas en la ruta de glicosilación (por ejemplo FUT8 [α 1,6-fucosiltransferasa] y/o β 1-4-N-acetilglucosaminiltransferasa III [GnTIII]), mediante la modificación de hidratos(s) de carbono después de que la IgG haya sido expresada, o mediante la expresión del anticuerpo en presencia de análogos de fucosa como inhibidores enzimáticos. Otros métodos para modificar las glicoformas de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento incluyen el uso de cepas de levadura glucomanipuladas (Li et al, 2006, Nature Biotechnology 24(2): 210-215), musgo (Nechansky et al, 2007, Mol Immunol 44(7): 1826-8) y plantas (Cox et al, 2006, Nat Biotechnol 24 (12): 1591-7). El uso de un método en particular para generar una glicoforma modificada no está destinado a limitar las realizaciones a ese método. Por el contrario, las realizaciones descritas en este documento abarcan inmunoadhesinas CTLA4-Ig con glicoformas modificadas con independencia de la forma en la que se produzcan.

En una realización, las inmunoadhesinas CTLA4-Ig descritas en este documento son glucomanipuladas para alterar el nivel de sialilación. Los niveles más altos de glicanos Fc sialilados en moléculas de inmunoadhesina G CTLA4-Ig pueden afectar negativamente a los efectos funcionales (Scallon et al, 2007, Mol Immunol 44(7): 1524-34), y las diferencias en los niveles de sialilación Fc pueden dar como resultado una actividad-inflamatoria modificada (Kaneko et al, 2006, Science 313: 670-673). Debido a que los anticuerpos pueden adquirir propiedades anti-inflamatorias sobre la sialilación del polisacárido del núcleo Fc, puede ser ventajoso glico-modificar las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento para conseguir un mayor o un menor contenido de ácido siálico Fc.

La glicoforma modificada genéticamente típicamente se refiere a los diferentes hidratos de carbono u oligosacárido; así, por ejemplo, una inmunoglobulina puede comprender una glicoforma de ingeniería. Como alternativa, la glicoforma de ingeniería puede referirse a la inmunoadhesina CTLA4-Ig que comprende el diferente hidrato de carbono u oligosacárido. En una realización, una composición de acuerdo con la invención comprende un inmunoadhesina CTLA4-Ig glicosilada que tiene una región Fc, en la que aproximadamente de 51 a 100 % del anticuerpo glicosilado, por ejemplo, 80-100 %, 90-100 %, 95-100 %, etc. del anticuerpo en la composición comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa. En otra realización, el anticuerpo en la composición tanto comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de fucosa como, además, comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En una realización alternativa, una composición comprende un inmunoadhesina CTLA4-Ig glicosilada que tiene una región Fc, en la que aproximadamente de 51 a 100 % del anticuerpo glicosilado, 80-100 %, o 90 a 100 %, del anticuerpo en la

composición comprende una estructura de núcleo de carbohidrato maduro que carece de ácido siálico. En otra realización, el anticuerpo en la composición tanto comprende una estructura de carbohidrato central madura que carece de ácido siálico como, además, comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En aún otra realización, una composición comprende una inmunoadhesina CTLA4-Ig glicosilada que tiene una región Fc, en la que aproximadamente de 51 a 100 % del anticuerpo glicosilado, 80-100 %, o de 90 a 100 %, del anticuerpo en la composición comprende una estructura de núcleo de carbohidrato maduro que contiene ácido siálico. En otra realización, el anticuerpo en la composición comprende tanto una estructura de carbohidrato central madura que contiene ácido siálico como, además, comprende al menos una modificación de aminoácido en la región Fc. En otra realización, la combinación de la modificación por ingeniería de la glicoforma y del aminoácido ofrece óptimas propiedades de unión a los receptores de Fc al anticuerpo.

Otras modificaciones

Las inmunoadhesinas CTLA4-Ig descritas en este documento pueden comprender una o más modificaciones que proporcionan propiedades optimizadas. Dichas modificaciones pueden ser modificaciones de aminoácidos o pueden ser modificaciones que se hacen enzimáticamente o químicamente. Tal o tales modificaciones probablemente proporcionar alguna mejora en la inmunoadhesina CTLA4-Ig, por ejemplo, una mejora en su estabilidad, solubilidad, función o uso clínico. Se da a conocer en el presente documento una variedad de mejoras que se pueden hacer mediante el acoplamiento de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento con modificaciones adicionales.

En una realización, se hacen modificaciones para mejorar las propiedades biofísicas de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento, incluyendo, pero no limitadas a la estabilidad, solubilidad, y el estado oligomérico. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, sustituciones que proporcionan interacciones intramoleculares más favorables en la inmunoadhesina CTLA4-Ig tal como para proporcionar una mayor estabilidad, o la sustitución de aminoácidos no polares expuestos con aminoácidos polares para mayor solubilidad. Otras modificaciones a las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento incluyen aquellas que permiten la formación específica o moléculas homodiméricas o homomultiméricas. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a disulfuros de ingeniería, así como modificaciones químicas o métodos de agregación.

En realizaciones adicionales, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento comprenden modificaciones que eliminan los sitios de degradación proteolítica. Estos pueden incluir, por ejemplo, los sitios de proteasa que reducen los rendimientos de producción, así como los sitios de proteasa que degradan la proteína administrada in vivo. En una realización, se realizan modificaciones adicionales para eliminar los sitios de degradación covalentes tales como la desamidación (es decir, la desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes residuos de glutamilo y aspártico), la oxidación, y los sitios de degradación proteolíticos. Los sitios de desamidación que son particularmente útiles para eliminar son los que tienen propensión a mejorar la desamidación, incluyendo, pero no limitado a los residuos de asparaginilo y glutamilo seguido de glicinas (motivos NG y QG, respectivamente). En tales casos, la sustitución de cualquiera de los residuos puede reducir significativamente la tendencia a la desamidación. Sitios de oxidación comunes son los residuos de metionina y cisteína. Otras modificaciones covalentes, que pueden o bien ser introducidas o eliminadas, incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los "grupos -amino de la lisina, arginina, y cadenas laterales de histidina, la acetilación de la N amina-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal. Modificaciones adicionales también pueden incluir, pero no se limitan a modificaciones postraduccionales, tales como glicosilación N-ligada u O-ligada y fosforilación.

Las modificaciones pueden incluir aquellas que mejoran la expresión y/o la purificación de los rendimientos a partir de células huéspedes o huéspedes comúnmente utilizados para la producción de sustancias biológicas. Estos incluyen, pero no se limitan a diversas líneas de células de mamíferos (por ejemplo, CHO), líneas de células de levadura, líneas celulares de las bacterias y plantas. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas para formar enlaces disulfuro entre cadenas. Las modificaciones adicionales incluyen modificaciones que eliminan o reducen la capacidad de las cadenas pesadas para formar enlaces disulfuro intracatenarios.

Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden comprender modificaciones que incluyen el uso de aminoácidos no naturales incorporados usando, incluyendo, pero no limitado, a los métodos descritos en Liu y Schultz, 2010, Annu Rev Biochem 79: 413-444.

En algunas realizaciones, estas modificaciones permiten la manipulación de varias propiedades, discutidas anteriormente, inmunológicas, funcionales, biofísicas o de fabricación. En realizaciones adicionales, estas modificaciones permiten otras modificaciones químicas para otros fines.

Otras modificaciones se contemplan en el presente documento. Por ejemplo, la inmunoadhesina CTLA4-Ig puede estar unida a una de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioxilalquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol. Otras modificaciones de aminoácidos adicionales se pueden incluir para permitir la modificación postraduccionales química específica o no específica de las

inmunoadhesinas de CTLA4-Ig. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan, a la PEGilación y la glicosilación. Sustituciones específicas que pueden ser utilizadas que permiten la PEGilación incluyen, pero no se limitan, a la introducción de nuevos residuos de cisteína o aminoácidos no naturales, tal que se pueden utilizar químicas de acoplamiento eficaces y específicas para conectar un PEG u otro resto polimérico. La introducción de sitios de glicosilación específicos se puede conseguir mediante la introducción de nuevas secuencias N-X-T/S en las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento.

Las modificaciones para reducir la inmunogenicidad pueden incluir modificaciones que reducen la unión de péptidos procesados derivados de la secuencia matriz a las proteínas del MHC. Por ejemplo, se pueden diseñar modificaciones de aminoácidos de tal manera que no haya o haya un número mínimo de epítomos inmunitarios que se predice que se unan, con alta afinidad, a cualquier alelo MHC prevalente. Varios métodos de identificación de los epítomos de unión de MHC en las secuencias de proteínas son conocidos en la técnica y pueden ser usados para marcar epítomos en un anticuerpo descrito en este documento.

Las modificaciones covalentes se incluyen dentro del alcance de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento, y son generalmente, pero no siempre, hechas después de la traducción. Por ejemplo, se pueden introducir varios tipos de modificaciones covalentes en la molécula haciendo reaccionar los residuos de aminoácidos específicos con un agente derivatizante orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos N- o C-terminal. En algunas realizaciones, la modificación covalente de las inmunoglobulinas descritas en este documento comprende la adición de uno o más marcadores. La expresión "grupo marcador" significa cualquier marcador detectable. En algunas realizaciones, el grupo marcador se acopla a la inmunoadhesina CTLA4-Ig a través de brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. Varios métodos para las proteínas marcadoras son conocidos en la técnica y pueden ser utilizados en la generación de inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento.

En una realización, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento son "proteínas de fusión", a veces denominadas en esta memoria "conjugados". La pareja de fusión o pareja de conjugado puede ser proteínica o no proteínica; esta última generalmente se genera usando grupos funcionales en la inmunoadhesina CTLA4-Ig y en la pareja del conjugado. Las parejas del conjugado y de fusión pueden ser cualquier molécula, incluyendo compuestos químicos de moléculas pequeñas y polipéptidos. Por ejemplo, una variedad de conjugados y métodos se describen en Trail et al., 1999, Curr. Opin. Immunol. 11: 584-588.

Posibles parejas conjugadas incluyen, pero no se limitan, a citoquinas, agentes citotóxicos, toxinas, radioisótopos, agentes quimioterapéuticos, agentes antiangiogénicos, a inhibidores de tirosina quinasa, y otros agentes terapéuticamente activos. En algunas realizaciones, las parejas conjugadas pueden considerarse más como cargas útiles, es decir que el objetivo de un conjugado está dirigido a la entrega de la pareja conjugada a una célula diana, por ejemplo, una célula cancerosa o célula inmunitaria, por la inmunoadhesina CTLA4-Ig. Así, por ejemplo, la conjugación de una toxina a una inmunoadhesina CTLA4-Ig se dirige a la entrega de dicha toxina a células que expresan el antígeno diana. Como se apreciará por un experto en la técnica, en realidad, los conceptos y las definiciones de fusión y conjugado se solapan. La designación de una fusión o conjugado no está destinada a limitar a cualquier realización particular descrita en el presente documento. Más bien, estos términos se utilizan libremente para transmitir el concepto amplio de que cualquier inmunoadhesina CTLA4-Ig de acuerdo con la invención puede estar relacionada genéticamente, químicamente, o de otra manera, con uno o más polipéptidos o moléculas que proporcionen alguna propiedad deseable.

Producción de inmunoadhesinas CTLA4-Ig

También se describen en este documento métodos para producir y probar experimentalmente inmunoadhesinas de CTLA4-Ig. Los métodos descritos no están destinados a limitar las realizaciones para cualquier aplicación o teoría de operación particular. Más bien, los métodos proporcionados tienen el propósito de ilustrar generalmente que una o más inmunoadhesinas de CTLA4-Ig pueden ser producidas y probadas experimentalmente para obtener inmunoadhesinas de CTLA4-Ig. Los métodos generales para la biología molecular de anticuerpos y de proteínas, la expresión, la purificación y el cribado se describen en Antibody Engineering, editado por Kontermann y Dubel, Springer, Heidelberg, 2001; y Hayhurst y Georgiou, 2001, Curr Opin Chem Biol 5: 683-689; Maynard y Georgiou, 2000, Annu Rev Biomed Eng 2: 339-76.

En una realización descrita en este documento, se crean ácidos nucleicos que codifican las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig, y que pueden entonces ser clonados en células huésped, expresados y ensayados, si se desea. Por lo tanto, los ácidos nucleicos, y el ADN en particular, se pueden hacer para que codifiquen cada secuencia de la proteína. Estas prácticas se llevan a cabo utilizando procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, una variedad de métodos que pueden encontrar uso en la generación de inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento se describen en Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 3ª Ed.

(Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 2001), y Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons). Hay una variedad de técnicas que pueden utilizarse para generar eficientemente ADN de codifica las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento. Tales métodos incluyen pero no se limitan a los

métodos de ensamblaje de genes, método basado en la PCR y los métodos que utilizan variaciones de PCR, métodos basados en la reacción en cadena de la ligasa, los métodos de oligo agrupados, tales como los utilizados en combinación aleatoria sintética, métodos de amplificación propensos a errores y métodos que utilizan oligos con mutaciones al azar, métodos de mutagénesis dirigida al sitio clásicos, mutagénesis de casete y otros métodos de amplificación y de síntesis de genes. Como se sabe en la técnica, hay una variedad de kits disponibles en el mercado y métodos para el ensamblaje de genes, mutagénesis, subclonación de vectores y similares, y tales productos comerciales encuentran uso en la generación de ácidos nucleicos que codifican las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig.

Las proteínas de inmunoadhesina de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden ser producidas cultivando una célula huésped transformada con ácido nucleico, por ejemplo, un vector de expresión, que contiene ácido nucleico que codifica las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig, en las condiciones apropiadas para inducir o causar la expresión de la proteína. Las condiciones apropiadas para la expresión variarán con la elección del vector de expresión y la célula huésped, y serán comprobadas fácilmente por un experto en la técnica a través de la experimentación de rutina. Una amplia variedad de células huésped apropiadas se puede utilizar, incluyendo, pero no limitado a células de mamíferos, bacterias, células de insectos, levaduras, y células de plantas. Por ejemplo, una variedad de líneas celulares que pueden encontrar uso en la generación de inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento se describen en el catálogo de la línea celular ATCC®, disponible de la American Type Culture Collection.

En una realización, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig se expresan en sistemas de expresión de mamíferos, incluyendo los sistemas en los que las construcciones de expresión se introducen en las células de mamífero utilizando virus tales como retrovirus o adenovirus. Cualquier célula de mamífero se puede utilizar, por ejemplo, células de ser humano, ratón, rata, hámster y primates. Las células adecuadas también incluyen células de investigación conocidas, incluyendo, pero no limitadas a células T Jurkat, NIH3T3, CHO, BHK, COS, HEK293, PER C.6, HeLa, Sp2/0, células NSO y las variantes de las mismas. En una realización alternativa, las proteínas de la biblioteca se expresan en células bacterianas. Los sistemas de expresión bacterianos son bien conocidos en la técnica, e incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*), *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus lividans*. En realizaciones alternativas, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig se producen en células de insecto (por ejemplo, Sf21/Sf9, *Trichoplusia ni* Bti-Tn5b1-4) o células de levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*, *Pichia*, etc). En una realización alternativa, las inmunoadhesinas CTLA4-Ig se expresan in vitro usando sistemas de traducción libres de células. En los sistemas de traducción in vitro derivados tanto de procariotas (por ejemplo, *E. coli*) como de eucariotas (por ejemplo, germen de trigo, reticulocitos de conejo) las células están disponibles y pueden ser elegidas en base a los niveles de expresión y las propiedades funcionales de la proteína de interés. Por ejemplo, como apreciarán los expertos en la técnica, se requiere la traducción in vitro para algunas tecnologías de visualización, por ejemplo, de expresión de ribosomas. Además, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig pueden ser producidas por métodos de síntesis química. También, los sistemas de expresión transgénicos ambos animales (por ejemplo, leche de vaca, oveja o cabra, huevos de gallina embrionados, larvas de insectos enteras, etc.) y plantas (por ejemplo, maíz, tabaco, lenteja de agua, etc.)

Los ácidos nucleicos que codifican las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden ser incorporados en un vector de expresión con el fin de expresar la proteína. Una variedad de vectores de expresión se puede utilizar para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión pueden comprender vectores auto-replicantes extra-cromosómicos o vectores que se integran en un genoma huésped. Los vectores de expresión se construyen para ser compatibles con el tipo de célula huésped. Así, los vectores de expresión que encuentran uso en la generación de inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento incluyen, pero no se limitan a los que permiten la expresión de proteínas en células de mamíferos, bacterias, células de insecto, de levadura, y en sistemas in vitro. Como se sabe en la técnica, una variedad de vectores de expresión está disponible comercialmente o de otro modo, que pueden encontrar uso para la expresión de inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento.

Los vectores de expresión comprenden típicamente una proteína unida operativamente con secuencias de control o reguladoras, marcadores seleccionables, cualquier pareja de fusión, y/o elementos adicionales. Por "unido operativamente" en el presente documento se quiere decir que el ácido nucleico se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen ácidos nucleicos reguladores de la transcripción y de la traducción unidos operativamente al ácido nucleico que codifica la inmunoadhesina CTLA4-Ig y son típicamente apropiados para la célula huésped utilizada que expresa la proteína. En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden incluir secuencias promotoras, sitios de unión ribosómicos, secuencias de inicio y de parada de la traducción, y secuencias transcripcionales de inicio y de parada, y secuencias potenciadoras o activadoras. Como también se conoce en la técnica, los vectores de expresión contienen típicamente un gen de selección o marcador para permitir la selección de células huésped transformadas que contienen el vector de expresión. Los genes de selección son bien conocidos en la técnica y variarán con la célula huésped usada.

Las inmunoadhesinas CTLA4-Ig pueden ser unidas operativamente a una pareja de fusión para permitir la orientación de la proteína expresada, purificación, detección, expresión y similares. Las parejas de fusión pueden

estar unidos a la secuencia de inmunoadhesina CTLA4-Ig a través de una secuencia de unión. La secuencia de enlazador comprenderá generalmente un pequeño número de aminoácidos, típicamente de menos de diez, aunque también pueden usarse enlazadores más largos. Típicamente, las secuencias de enlazador son seleccionadas para ser flexibles y resistentes a la degradación. Como se apreciará por los expertos en la técnica, cualquiera de una amplia variedad de secuencias puede utilizarse como enlazadores. Por ejemplo, una secuencia de enlazador común comprende la secuencia de aminoácidos GGGGS [SEQ ID NO: 40]. Una pareja de fusión puede ser una secuencia de reconocimiento o señal que reconoce la inmunoadhesina CTLA4-Ig y cualesquiera parejas de fusión asociadas a una localización celular deseada o al medio extracelular. Como se sabe en la técnica, ciertas secuencias de señalización se pueden orientar a una proteína para ser secretada ya sea en el medio de crecimiento, o en el espacio periplásmico, localizado entre la membrana interna y externa de la célula. Una pareja de fusión también puede ser una secuencia que codifica un péptido o una proteína que permite la purificación y/o la detección. Tales parejas de fusión incluyen, pero no se limitan a los marcadores de polihistidina (His-marcadores) (por ejemplo, H6 y H10 u otras marcadores para su uso con sistemas de cromatografía de afinidad metálicos inmovilizados (IMAC) (por ejemplo, columnas de afinidad de Ni^{+2})), fusiones GST, fusiones MBP, Strep-tag, la secuencia diana de biotilación de BSP de la enzima bacteriana BirA, y marcadores de epítipo, que son el objetivo de los anticuerpos (por ejemplo, marcadores c-myc, flag-marcadores, y similares). Como se apreciará por los expertos en la técnica, tales marcadores pueden ser útiles para la purificación, para la detección, o ambas cosas. Por ejemplo, una inmunoadhesina CTLA4-Ig se puede purificar utilizando un His-marcador inmovilizando a una columna de afinidad de Ni^{+2} , y a continuación, después de la purificación de la misma His-marcador puede ser usado para inmovilizar el anticuerpo a una placa recubierta con Ni^{+2} para llevar a cabo un ensayo de unión ELISA u otro (tal como se describe a continuación). Una pareja de fusión puede permitir el uso de un método de selección para seleccionar las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig (véase abajo). Las parejas de fusión que permiten una variedad de métodos de selección son bien conocidas en la técnica.

En una realización, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig se purifican o aíslan después de la expresión. Las proteínas pueden aislarse o purificarse en una variedad de formas conocidas por los expertos en la técnica. La purificación puede ser particularmente útil en la invención para la separación de especies de la cadena pesada heterodiméricas a partir de especies de cadena pesada homodiméricas, tal como se describe en el presente documento. Los métodos de purificación estándar incluyen técnicas cromatográficas, incluyendo intercambio iónico, interacción hidrofóbica, afinidad, de tamaño o de filtración en gel, y de fase inversa, llevado a cabo a presión atmosférica o a presión elevada usando sistemas tales como FPLC y HPLC. Los métodos de purificación incluyen también técnicas electroforéticas, de enfoque isoeléctrico, inmunológicas, de precipitación, de diálisis y de cromatoenfoco. Las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, conjuntamente con la concentración de proteínas, también son útiles. Como es bien conocido en la técnica, una variedad de proteínas naturales se une a Fc y anticuerpos, y estas proteínas pueden encontrar uso para la purificación de inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento. Por ejemplo, las proteínas bacterianas A y G se unen a la región Fc. Del mismo modo, la proteína bacteriana L se une a la región Fab de algunos anticuerpos, como, por supuesto, lo hace el antígeno diana del anticuerpo. La purificación a menudo puede ser activada por una pareja de fusión particular. Por ejemplo, las inmunoadhesinas CTLA4-Ig pueden purificarse utilizando resina de glutatión si se emplea una fusión GST, cromatografía de afinidad de Ni^{+2} si se emplea un His-marcador, o anticuerpo anti-flag inmovilizado si se utiliza un flag-marcador. Para una guía general en las técnicas de purificación adecuadas, véase, por ejemplo, incorporadas por referencia en su totalidad *Protein Purification: Principles and Practice*, 3ª Ed, Scopes, Springer-Verlag, Nueva York, 1994, incorporado por referencia en su totalidad. El grado de purificación necesario variará dependiendo de la selección o el uso de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig. En algunos casos no es necesaria la purificación. Por ejemplo, en una realización, si se secretan las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig, la detección puede tener lugar directamente desde los medios. Como es bien conocido en la técnica, algunos de los métodos de selección no implican la purificación de proteínas.

Experimentación in vitro

Pueden ser probadas experimentalmente inmunoadhesinas CTLA4-Ig usando una variedad de métodos in vitro, incluyendo, pero no limitado a, los que utilizan ensayos de unión, ensayos basados en células y las tecnologías de selección. Pueden utilizarse tecnologías de automatización y cribado de alto rendimiento en los procedimientos de selección. La selección puede emplear el uso de una pareja de fusión o marcador. El uso de parejas de fusión se ha discutido anteriormente. Por "marcado" en la presente memoria se entiende que las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento tienen uno o más elementos, isótopos o compuestos químicos unidos para permitir la detección en un cribado. En general, los marcadores se dividen en tres clases: a) marcadores inmunitarios, que pueden ser un epítipo constituido como una pareja de fusión que es reconocida por un anticuerpo, b) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radioactivos o pesados, y c) marcadores de pequeñas moléculas, que pueden incluir colorantes fluorescentes y colorimétricos, o moléculas tales como biotina que permiten otros métodos de marcado. Los marcadores pueden ser incorporados en el compuesto en cualquier posición y se pueden incorporar in vitro o in vivo durante la expresión de la proteína.

En una realización, las propiedades funcionales y/biofísicas de inmunoadhesinas de CTLA4-Ig se criban en un ensayo in vitro. Los ensayos in vitro pueden permitir un amplio rango dinámico para la detección de propiedades de interés. Particularmente relevante para la presente invención, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig se pueden ensayar por su afinidad para uno o más antígenos. Las propiedades que se pueden seleccionar incluyen, pero no se limitan a

la estabilidad, solubilidad y afinidad por ligandos Fc, por ejemplo, FcγRs. Múltiples propiedades se pueden seleccionar simultáneamente o de forma individual. Las proteínas se pueden purificar o dejar sin purificar, dependiendo de los requisitos del ensayo. En una realización, la selección es un ensayo de unión cualitativo o cuantitativo para la unión de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig a una proteína o molécula no proteica que se sabe o se cree que se une la inmunoadhesina CTLA4-Ig. En una realización, la selección es un ensayo de unión para medir la unión al antígeno diana. En una realización alternativa, la selección es un ensayo para la unión de las inmunoadhesinas CTLA4-Ig a un ligando Fc, incluyendo, pero no se limitan a la familia de FcγRs, el receptor neonatal FcRn, la proteína del complemento C1q, y las proteínas bacterianas A y G. Dichos ligandos Fc pueden ser de cualquier organismo. En una realización, los ligandos Fc son de seres humanos, ratones, ratas, conejos, y/o monos. Los ensayos de unión se pueden llevar a cabo utilizando una variedad de métodos conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitado a ensayos basados en FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia) y BRET (Transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia), AlphaScreen™ (Ensayo Homogéneo de Proximidad Luminiscente Amplificado), Ensayo de proximidad de centelleo, ELISA (Inmunoensayo ligado a enzima), SPR (Resonancia de Plasmón de Superficie, también conocido como BiaCore®), calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría diferencial de barrido, electroforesis en gel y cromatografía, incluida de filtración en gel. Estos y otros métodos pueden aprovechar algunas parejas de fusión o marcadores de la inmunoadhesina CTLA4-Ig. Los ensayos pueden emplear una variedad de métodos de detección, incluyendo, pero no limitados a marcadores cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes o isotópicos.

Las propiedades biofísicas de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig, por ejemplo, la estabilidad y la solubilidad, se pueden ensayar usando una variedad de métodos conocidos en la técnica. La estabilidad de la proteína puede determinarse midiendo el equilibrio termodinámico entre los estados plegado y desplegado. Por ejemplo, las inmunoadhesinas CTLA4-Ig descritas en este documento pueden ser desplegadas utilizando química desnaturante, calor o pH, y esta transición pueden ser monitoreadas usando métodos incluyendo, pero no limitados a la espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de absorbancia, espectroscopia RMN, calorimetría y proteólisis. Como se apreciará por los expertos en la técnica, los parámetros cinéticos del plegado y desplegado que se desarrollan también pueden ser monitorizados utilizando estas y otras técnicas. La solubilidad y la integridad estructural general de una inmunoadhesina CTLA4-Ig pueden ser cuantitativa o cualitativamente determinadas usando una amplia gama de métodos que son conocidos en la técnica. Los métodos que pueden encontrar uso para la caracterización de las propiedades biofísicas de inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento incluyen electroforesis en gel, isoelectroenfoque, electroforesis capilar, cromatografía, tal como cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, mapeo de péptidos, mapeo de oligosacárido, espectrometría de masas, espectroscopia de absorbancia ultravioleta, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de dicroísmo circular, calorimetría de titulación isotérmica, calorimetría diferencial de barrido, análisis por ultra-centrifugación, dispersión de luz dinámica, proteólisis, y la reticulación, la medición de la turbidez, ensayos de retardo en filtro, ensayos inmunológicos, ensayos de unión de colorantes fluorescentes, ensayos de tinción de proteínas, microscopia, y la detección de los agregados a través de ELISA u otros ensayos de unión. También pueden usarse análisis estructural, que emplea técnicas cristalográficas de rayos X, y espectroscopia RMN. En una realización, la estabilidad y/o la solubilidad pueden medirse mediante la determinación de la cantidad de solución de proteína después de un periodo de tiempo definido. En este ensayo, la proteína puede o no puede ser expuesta a alguna condición extrema, por ejemplo, a temperaturas elevadas, un pH bajo o a la presencia de un agente desnaturante. Dado que la función requiere típicamente una proteína estable, soluble, y/o bien plegada/estructurada, los ensayos funcionales y de unión antes mencionados también proporcionan formas de realizar una medición de este tipo. Por ejemplo, una solución que comprende una inmunoadhesina CTLA4-Ig podría ensayarse por su capacidad para unirse al antígeno diana, se expone entonces a una temperatura elevada durante uno o más periodos de tiempo definidos y, a continuación, se ensaya la unión al antígeno de nuevo. Puesto que la proteína desplegada y agregada no se espera que sea capaz de la unión al antígeno, la cantidad de actividad restante proporciona una medida de la estabilidad y la solubilidad de la inmunoadhesina CTLA4-Ig.

En una realización, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig se pueden ensayar usando uno o más ensayos in vitro o basados en células. Para tales ensayos, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig, purificadas o no purificadas, son típicamente añadidas exógenamente tal que las células se exponen a las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento. Estos ensayos tienen típicamente, pero no siempre, base en la biología de la capacidad de la inmunoadhesina CTLA4-Ig de unirse al antígeno diana y median algún acontecimiento bioquímico, por ejemplo, funciones efectoras, tal como la lisis celular, la fagocitosis, inhibición de la unión del ligando/receptor, la inhibición del crecimiento y/o proliferación, la inhibición de la liberación de calcio y/o de señalización, la apoptosis y similares. Tales ensayos a menudo incluyen el seguimiento de la respuesta de las células frente a la inmunoadhesina CTLA4-Ig, por ejemplo, la supervivencia celular, la muerte celular, la fagocitosis celular, la lisis celular, el cambio en la morfología celular, o la activación transcripcional, tal como la expresión celular de un gen natural o gen reportero. Por ejemplo, tales ensayos pueden medir la capacidad de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig que provocan la muerte celular, por ejemplo, ADCC, ADCP y CDC. Los ensayos que miden la muerte celular que está mediada por la interacción conjunta de antígenos son particularmente relevantes para la invención. Para algunos ensayos de células o componentes adicionales, es decir, además de las células diana, puede ser necesario añadir, por ejemplo, el complemento en suero o células efectoras, tales como monocitos de sangre periférica (PBMC), células NK, macrófagos, células T y similares. Dichas células adicionales pueden ser de cualquier organismo, por ejemplo, seres

humanos, ratones, rata, conejo y mono. Los anticuerpos reticulados o monómeros pueden provocar la apoptosis de ciertas líneas celulares, que expresan el antígeno diana del anticuerpo, o pueden mediar el ataque en células diana por células inmunitarias que se han añadido al ensayo. Los métodos para controlar la muerte celular o la viabilidad son conocidos en la técnica e incluyen el uso de reactivos colorantes, fluoróforos, inmunoquímicos, citoquímicos y radiactivos. Por ejemplo, los ensayos de caspasa o anexina-fluoroconjugados pueden permitir la apoptosis que se desea medir, y la absorción o liberación de sustratos radioactivos (por ejemplo, ensayos de liberación de cromo-51) o la reducción metabólica de colorantes fluorescentes, tales como el azul alamar pueden permitir el crecimiento celular, la proliferación o la activación a monitorizar. En una realización, se utiliza el ensayo de citotoxicidad basado en DELFIA EuTDA (Perkin Elmer, Mass.). Alternativamente, las células diana muertas o dañadas pueden ser controladas mediante la medición de la liberación de una o más proteínas intracelulares naturales, por ejemplo, de lactato deshidrogenasa. La activación transcripcional también puede servir como un método para ensayar la función en los ensayos basados en células. En este caso, la respuesta puede monitorizarse mediante el ensayo de genes naturales o proteínas que pueden ser sobre-reguladas o reguladas; por ejemplo, se puede medir la liberación de ciertas interleucinas, o, alternativamente, puede la lectura puede ser a través de una luciferasa o del constructo indicador GFP. Los ensayos basados en células también pueden incluir la medida de cambios morfológicos de las células como respuesta a la presencia de una inmunoadhesina CTLA4-Ig. Los tipos de células para tales ensayos pueden ser procariotas o eucariotas, y se puede emplear una variedad de líneas celulares que son conocidos en la técnica. Alternativamente, las selecciones basadas en células se llevan a cabo utilizando células que han sido transformadas o transfectadas con ácidos nucleicos que codifican las inmunoadhesinas de CTLA1-Ig.

Experimentación in vivo

Las propiedades biológicas de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden ser caracterizadas en células, tejidos y en experimentos de organismos enteros.

Como se muestra en el presente documento, en general, la prueba de la unión y las afinidades asociados de los dominios de la variante de CTLA4 de las inmunoadhesinas de la invención se realiza mediante los ensayos de unión que se indican en los ejemplos. Como se describió anteriormente, la afinidad puede ser descrita como mejor cuando la KA de un polipéptido variante con respecto al polipéptido matriz es significativamente más alta o cuando la KD de un polipéptido variante es significativamente menor con relación a un polipéptido matriz. Cuando se expresa en términos de una relación, por ejemplo, KA (polipéptido variante)/KA (polipéptido matriz) o KD (polipéptido matriz)/KD (variante de polipéptido), un aumento significativo en la afinidad es testigo, por ejemplo, cuando una y/o ambas de estas relaciones es de aproximadamente 1,2, 1,5, 2,0, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 100, 250, 500, 1.000 o más.

Como se sabe en la técnica, los medicamentos se prueban a menudo en animales, incluyendo, pero no limitados a ratones, ratas, conejos, perros, gatos, cerdos y monos, a fin de medir la eficacia de un fármaco para el tratamiento frente a una enfermedad o un modelo de la enfermedad, o para medir la farmacocinética de un fármaco, toxicidad y otras propiedades. Dichos animales pueden ser referidos como modelos de enfermedad. Con respecto a las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento, un desafío particular surge cuando el uso de modelos animales evalúa el potencial para la eficacia en seres humanos de polipéptidos candidatos; esto es debido, al menos en parte, al hecho de que los dominios Fc de la inmunoadhesinas de CTLA4-Ig que tienen un efecto específico sobre la afinidad para un receptor de Fc humano no pueden tener un efecto de afinidad similar con el receptor de animales ortólogos. Estos problemas pueden agravarse aún más por las inevitables ambigüedades asociadas con la asignación correcta de los verdaderos ortólogos (Mechetina et al, 2002, Immunogenetics 54: 463-468), y el hecho de que algunos ortólogos simplemente no existen en el animal. Las terapias se prueban a menudo en ratones, incluyendo, pero no limitadas, a ratones desnudos, ratones Rag-deficientes, ratones SCID, ratones de xenoinjerto y ratones transgénicos (incluyendo con inserción génica y con desactivación génica). Las inmunoadhesinas CTLA4-Ig terapéuticas en el presente documento pueden ser probadas en cepas de ratón NZB, NOD, BXSB, MRL/lpr, K/BxN y transgénicas (incluyendo con inserción génica y con desactivación génica). Tales ratones pueden desarrollar varias condiciones autoinmunitarias que asemejan patologías de enfermedades específicas de órganos humanos, autoinmunitarias sistémicas o inflamatorias, tales como el lupus eritematoso sistémico (LES) y la artritis reumatoide (AR). Por ejemplo, una inmunoadhesina CTLA4-Ig descrita en este documento destinada a las enfermedades autoinmunitarias se puede ensayar en estos modelos de ratón mediante el tratamiento de los ratones para determinar la capacidad de la inmunoadhesina CTLA4-Ig que reduce o inhibe el desarrollo de la patología de la enfermedad. Debido a la incompatibilidad entre el sistema receptor de Fc gamma de ratón y humano, un enfoque alternativo es utilizar un modelo de SCID murino en el que ratones inmunodeficientes se injertaron con los PBL o PBMC humanos (huPBL-SCID, huPBMC-SCID) proporcionando un sistema inmunológico semifuncional humano con células efectoras humanas y receptores de Fc. Otros organismos, por ejemplo, mamíferos, también se pueden utilizar para las pruebas. Por ejemplo, debido a su similitud genética con los humanos, los monos pueden ser modelos terapéuticos adecuados y, por lo tanto, se pueden utilizar para probar la eficacia, toxicidad, farmacocinética u otra propiedad de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento. Las pruebas de las inmunoadhesinas CTLA4-Ig descritas en este documento en los seres humanos son en última instancia requeridas para su aprobación como medicamentos, por lo que, por supuesto, estos experimentos están contemplados. Así, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden ser

probadas en seres humanos para determinar su eficacia, toxicidad, farmacocinética, otras propiedades terapéuticas y/o clínicas.

En algunas realizaciones, las inmunoadhesinas CTLA4-Ig descritas en este documento pueden evaluarse atendiendo a la eficacia en modelos animales clínicamente relevantes de diversas enfermedades humanas. En muchos casos, los modelos relevantes incluyen varios animales transgénicos para antígenos y receptores específicos.

En una realización, la prueba de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig puede incluir el estudio de eficacia en primates (por ejemplo, el modelo del macaco cangrejero) para facilitar la evaluación de la depleción de las células diana específicas que albergan el antígeno diana. Los modelos de primates adicionales incluyen, pero no se limitan, al uso del mono Rhesus para evaluar las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig en los estudios terapéuticos autoinmunitarios, de trasplante y del cáncer.

Se llevan a cabo estudios de toxicidad para determinar los efectos relacionados con los medicamentos que no pueden ser evaluados en perfiles farmacológicos estándar, o se producen sólo después de la administración repetida del agente. La mayoría de los ensayos de toxicidad se realizan en dos especies, de roedor y no-roedor, para garantizar que cualquier efecto adverso inesperado no se pase por alto antes de que las nuevas entidades terapéuticas sean introducidas en el hombre. En general, estos modelos pueden medir una variedad de efectos tóxicos incluyendo la genotoxicidad, la toxicidad crónica, la inmunogenicidad, la toxicidad reproductiva/de desarrollo y la carcinogenicidad. Se incluyen dentro de los parámetros antes mencionados son, medidas estándar del consumo de alimentos, del peso corporal, de la formación de anticuerpos, la química clínica y el examen macro y microscópico de los órganos/tejidos normales (por ejemplo, la cardiotoxicidad). Los parámetros adicionales de medida son el trauma en el sitio de inyección y la medición de anticuerpos neutralizantes, si los hubiera. Tradicionalmente, los anticuerpos terapéuticos monoclonales, desnudos o conjugados, se evalúan atendiendo a la reactividad cruzada con tejidos normales, la inmunogenicidad/producción de anticuerpos, conjugado o toxicidad del enlazador y la toxicidad del "observador" de especies radiomarcadas. No obstante, estos estudios pueden tener que ser individualizados para abordar las preocupaciones específicas y siguiendo las directrices establecidas por el ICH S6 (estudios de seguridad para productos biotecnológicos, también indicados anteriormente). Como tal, los principios generales son que los productos estén suficientemente bien caracterizados, las impurezas/contaminantes sean eliminadas, que el material de ensayo sea comparable en todo el desarrollo y que se mantenga el cumplimiento de GLP.

La farmacocinética (PK) de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento se pueden estudiar en una variedad de sistemas animales, siendo los primates no humanos los más pertinentes, tales como los macacos cangrejeros y monos Rhesus. Las administraciones i.v./s.c. únicas o repetidas en un intervalo de dosis de 6000 veces (de 0,05 a 300 mg/kg) se pueden evaluar respecto a la semivida (de días a semanas) usando la concentración plasmática y el aclaramiento. El volumen de distribución en estado estacionario y el nivel de absorbancia sistémica también se pueden medir. Ejemplos de tales parámetros de medición generalmente incluyen la concentración plasmática máxima observada ($C_{m\acute{a}x}$), el tiempo para alcanzar la $C_{m\acute{a}x}$ ($T_{m\acute{a}x}$), el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo desde el tiempo 0 hasta el infinito [AUC (0-inf)] y la semivida de eliminación aparente ($T_{1/2}$). Los parámetros de medición adicionales podrían incluir el análisis compartimental de los datos de concentración-tiempo obtenidos tras la administración i.v. y biodisponibilidad.

Los estudios farmacodinámicos pueden incluir, pero no se limitan a, reconocer a las células específicas o bloquear los mecanismos de señalización, midiendo la inhibición de anticuerpos específicos de antígeno, etc. Las inmunoadhesinas CTLA4-Ig descritas en este documento pueden reconocer a poblaciones de células efectoras específicas y por lo tanto son medicamentos directos para inducir ciertas actividades para mejorar la potencia o para aumentar la penetración en un compartimiento fisiológico particularmente favorable. Tales efectos farmacodinámicos se pueden demostrar en modelos animales o en seres humanos.

Uso clínico

Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden encontrar uso en una amplia gama de productos. En una realización, una inmunoadhesina CTLA4-Ig descrita en este documento es un agente terapéutico, un diagnóstico, o un reactivo de investigación. Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig pueden encontrar uso en una composición que es monoclonal o policlonal. Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento se pueden usar para fines terapéuticos. Las inmunoadhesinas CTLA4-Ig se pueden administrar a un paciente para tratar trastornos.

Un "paciente" para los fines descritos en este documento incluye tanto a seres humanos como a otros animales, por ejemplo, otros mamíferos. Por lo tanto, las inmunoadhesinas CTLA4-Ig descritas en este documento tienen tanto, aplicaciones de terapia humana como veterinarias. El término "tratamiento" o "tratar", como se describe en el presente documento, se entiende que incluye el tratamiento terapéutico, así como medidas profilácticas o supresoras para una enfermedad o trastorno. Así, por ejemplo, la administración exitosa de una inmunoadhesina CTLA4-Ig antes de la aparición de la enfermedad da como resultado el tratamiento de la enfermedad. Como otro

ejemplo, la administración exitosa de una inmunoadhesina CTLA4-Ig optimizada después de la manifestación clínica de la enfermedad que combate los síntomas de la enfermedad comprende el tratamiento de la enfermedad. El "tratamiento" y "tratar" también abarcan la administración de una inmunoadhesina CTLA4-Ig optimizada después de la aparición de la enfermedad con el fin de erradicar la enfermedad. El éxito de la administración de un agente después del inicio y después de los síntomas clínicos se ha desarrollado, con una posible reducción de los síntomas clínicos y quizás la mejora de la enfermedad, comprende el tratamiento de la enfermedad. Aquellos "en necesidad de tratamiento" incluyen a mamíferos, ya que tienen la enfermedad o el trastorno, así como aquellos propensos a tener la enfermedad o el trastorno, incluyendo aquellos en los que debe prevenirse la enfermedad o el trastorno.

Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig en el presente documento se utilizan preferiblemente para el tratamiento de una condición relacionada con la inmunidad o el trastorno. Las condiciones inmunitarias relacionadas incluyen, pero no se limitan, a enfermedades autoinmunitarias, trastornos inflamatorios y a la prevención de la respuesta inmunitaria asociada con el rechazo del tejido del donante.

Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig en este documento pueden usarse para tratar enfermedades autoinmunitarias. Las "enfermedades autoinmunitarias" en este documento incluyen el rechazo alógeno del injerto de islotes, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípido, enfermedad autoinmunitaria de Addison, autoanticuerpos citoplasmáticos de antineutrófilos (ANCA), enfermedades autoinmunitarias de la glándula suprarrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, miocarditis autoinmunitaria, neutropenia autoinmunitaria, ovaritis autoinmunitaria y orquitis, trombocitopenia autoinmunitaria, urticaria autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampollar, cardiomiopatía, síndrome de Castleman, abeto-dermatitis celiaca, síndrome de disfunción inmunitaria de fatiga crónica, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad por crioaglutininas, enfermedad de Crohn, dermatomiositis, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, la deficiencia del factor VIII, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Grave, síndrome de Guillain-Barre, síndrome de Goodpasture, enfermedad de injerto contra huésped (GVHD), la tiroiditis de Hashimoto, la hemofilia A, la fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), neuropatía por IgA, polineuropatías de IgM, trombocitopenia mediada por inmunidad, artritis juvenil, enfermedad de Kawasaki, Plantus liquen, lupus eritematoso, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis múltiple, diabetes mellitus tipo 1, miastenia gravis, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Reynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjorgen, rechazo de trasplantes de órganos sólidos, el síndrome del hombre rígido, lupus eritematoso sistémico, la arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, púrpura trombocitopénica trombocitopenia, la colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis, tal como la dermatitis herpetiforme, vasculitis, vitiligo y granulomatosis de Wegener.

Las inmunoadhesinas CTLA4-Ig en este documento pueden usarse para tratar trastornos inflamatorios. Los "trastornos inflamatorios" en el presente documento incluyen el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), artritis séptica aguda, artritis adyuvante, la artritis idiopática juvenil, encefalomiелitis alérgica, rinitis alérgica, vasculitis alérgica, alergia, asma, aterosclerosis, la inflamación crónica debido a infecciones bacterianas o virales crónicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad de la arteria coronaria, encefalitis, enfermedad inflamatoria intestinal, osteólisis inflamatoria, inflamación asociada con reacciones de hipersensibilidad aguda y retardada, inflamación asociada con tumores, enfermedades de la lesión del nervio periférico o desmielinizantes, inflamación asociada con el trauma del tejido tales como quemaduras y la isquemia, la inflamación debido a meningitis, síndrome de lesión múltiple de órganos, fibrosis pulmonar, sepsis y choque séptico, síndrome de Stevens-Johnson, artropatía indiferenciada y espondiloartropatía indiferenciada.

Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig en el presente documento se pueden usar para prevenir o suprimir una respuesta inmunitaria asociada con el rechazo de un tejido donante, células, injerto o trasplante de órgano por un sujeto receptor. Las enfermedades relacionadas con el injerto o los trastornos incluyen la enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD), tal como el asociado con el trasplante de la médula ósea y los trastornos inmunitarios resultantes de o asociados con el rechazo de órganos, tejidos o trasplante de injertos de células (por ejemplo, aloinjertos o xenoinjertos de tejidos o de células), incluyendo, por ejemplo, injertos de piel, músculo, neuronas, islotes, órganos, células del parénquima del hígado, etc. Con respecto a un tejido de donante, el trasplante de células, injertos u órganos sólidos en un sujeto receptor, se cree que tales moléculas de la invención descritas en este documento (por ejemplo, la variante del polipéptido CTLA-4 ECD o la proteína de fusión de la variante de CTLA-4-Ig) pueden ser efectivas en la prevención del rechazo agudo de tal trasplante en el receptor y/o para terapias de mantenimiento a largo plazo que eviten el rechazo de tal trasplante en el receptor (por ejemplo, inhibir el rechazo del trasplante de células de los islotes productoras de insulina de un donante en el sujeto receptor que sufre de diabetes).

Los trastornos relacionados con la inmunidad preferidas que se pueden tratar por las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritos en este documento incluyen la enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, artritis psoriásica, psoriasis, artritis reumatoide, colitis ulcerosa y rechazo de trasplantes, incluyendo, pero no limitado, a trasplante de riñón, trasplante de hígado y el trasplante de páncreas.

Las inmunoadhesinas CTLA4-Ig en el presente documento se pueden usar para tratar el cáncer. "Cáncer" y "canceroso" en el presente documento se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma (incluyendo liposarcoma), tumores neuroendocrinos, mesotelioma, schwannoma, meningioma, adenocarcinoma, melanoma y leucemia o tumores malignos linfoides.

Las inmunoadhesinas CTLA4-Ig en este documento pueden usarse para tratar enfermedades infecciosas. Por "enfermedades infecciosas" en este documento se entiende las enfermedades causadas por patógenos, tales como virus, bacterias, hongos, protozoos y parásitos.

Además, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden usarse para prevenir o tratar condiciones adicionales incluyendo, pero no limitados, a enfermedades del corazón, tales como la insuficiencia cardíaca congestiva (CHF), la miocarditis y otras condiciones del miocardio; enfermedades de la piel tales como rosácea, acné y eczema; condiciones óseas y dentales, tales como pérdida ósea, osteoporosis, enfermedad de Paget, la histiocitosis de células de Langerhans, la enfermedad periodontal, osteopenia por desuso, osteomalacia, la displasia fibrosa monostótica, displasia fibrosa poliestótica, metástasis ósea, el tratamiento del dolor de los huesos, hipercalcemia maligna humoral, reconstrucción periodontal, lesión medular y fracturas óseas; condiciones metabólicas, tal como la enfermedad de Gaucher; condiciones endocrinas, tal como el síndrome de Cushing; y condiciones neurológicas y neurodegenerativas, tal como la enfermedad de Alzheimer.

Formulación

Se contemplan composiciones farmacéuticas en las que se formulan la inmunoadhesina CTLA4-Ig descrita en este documento y uno o más agentes activos terapéuticamente. Las formulaciones de las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento se preparan para el almacenamiento mezclando dicha inmunoadhesina CTLA4-Ig que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol orto-bencil-butílico; parabenos de alquilo tales como metil- o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoadhesinas de CTLA4-Ig; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; edulcorantes y otros agentes aromatizantes; cargas, tales como celulosa microcristalina, lactosa, maíz y otros almidones; agentes de unión; aditivos; agentes colorantes; contraiones formadores de sal, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). En una realización, la composición farmacéutica que comprende la inmunoadhesina CTLA4-Ig de acuerdo con la invención puede estar en una forma soluble en agua, tales como sales farmacéuticamente aceptables presentes; que se entiende que incluyen tanto sales de adición de ácido como de base. "Sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellas sales que retienen la eficacia biológica de las bases libres y que no son biológicamente, o de otra forma, indeseables, formadas con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares, y ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido maleico, ácido malónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico y similares. Las "sales de adición de base farmacéuticamente aceptables" incluyen las derivadas de bases inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio, magnesio, hierro, zinc, cobre, manganeso, aluminio y similares. Algunas realizaciones incluyen al menos una de las sales de amonio, potasio, sodio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases farmacéuticamente aceptables orgánicas no tóxicas incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas de origen natural sustituidas, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina y etanolamina. Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo pueden ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles u otros métodos.

Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento también pueden formularse como inmunoliposomas. Un liposoma es una vesícula pequeña que comprende varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos que son útiles para la administración de un agente terapéutico a un mamífero. Los liposomas que contienen la inmunoadhesina CTLA4-Ig se preparan por métodos conocidos en la técnica. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas. Liposomas particularmente útiles pueden generarse mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina

derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado.

La inmunoadhesina CTLA4-Ig y otros agentes terapéuticamente activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas por métodos que incluyen pero no se limitan a técnicas de coacervación, polimerización interfacial (por ejemplo, usando microcápsulas de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina o de poli(metilmetakrilato)), sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) y macroemulsiones. Tales técnicas se describen en el Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed., 1980.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos, cuyas matrices están en la forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metakrilato) o poli(alcohol vinílico)), poliláctidos, copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tales como el Lupron Depot® (que son microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida), ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico y ProLease® (disponible comercialmente de Alkermes), que es un sistema de administración basado en microesferas compuesto de la molécula bioactiva deseada incorporada en una matriz de poli-DL-lactida-co-glicólido (PLG).

Administración

La administración de la composición farmacéutica que comprende una inmunoadhesina CTLA4-Ig se describe en este documento, por ejemplo, en forma de una solución acuosa estéril, puede hacerse en una variedad de maneras, incluyendo, pero no limitado, a la vía oral, subcutánea, intravenosa, intranasal, intraóticamente, transdérmicamente, tópicamente (por ejemplo, geles, pomadas, lociones, cremas, etc.), por vía intraperitoneal, intramuscular, intrapulmonar, vaginal, matriz, rectal o intraocular. En algunos casos, por ejemplo, para el tratamiento de heridas, inflamación, etc., la inmunoadhesina CTLA4-Ig se puede aplicar directamente como una solución o un aerosol. Como se sabe en la técnica, la composición farmacéutica se puede formular en consecuencia dependiendo de la manera de introducción.

La administración subcutánea puede utilizarse en circunstancias en las que el paciente puede autoadministrarse la composición farmacéutica. Muchas proteínas terapéuticas no son lo suficientemente potentes para permitir la formulación de una dosis terapéuticamente eficaz en el volumen máximo aceptable para la administración subcutánea. Este problema puede ser abordado en parte por el uso de formulaciones de proteínas que comprenden arginina-HCl, histidina y polisorbato. Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden ser más susceptibles a la administración subcutánea debido a, por ejemplo, el aumento de la potencia, la mejora de la semivida en suero o la solubilidad mejorada. Como se sabe en la técnica, las proteínas terapéuticas son administradas a menudo por infusión IV o en bolo. Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento también se pueden administrar usando tales métodos. Por ejemplo, la administración puede ser por infusión intravenosa con cloruro de sodio al 0,9 % como un vehículo de infusión.

La administración pulmonar puede realizarse usando un inhalador o nebulizador y una formulación que comprende un agente de aerosolización. Por ejemplo, puede ser utilizada la tecnología inhalable AERx® comercialmente disponible de Aradigm, o el sistema de administración pulmonar Inhance™ comercialmente disponible de Nektar Therapeutics. Además, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden ser susceptibles a la administración oral.

Además, cualquiera de una serie de sistemas de administración es conocida en la técnica y se pueden usar para administrar las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan, a la encapsulación en liposomas, las micropartículas, las microesferas (por ejemplo, microesferas de PLA/PGA) y similares. Alternativamente, puede ser utilizado un implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas o fibras. Los sistemas de liberación sostenida pueden comprender un material polimérico o de matriz, tales como poliésteres, hidrogeles, poli(alcohol vinílico), poliláctidos, copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico, tales como el Lupron Depot®, y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. También es posible administrar un ácido nucleico que codifica una inmunoadhesina CTLA4-Ig descrita en este documento, por ejemplo, por infección retroviral, inyección directa o recubrimiento con lípidos, receptores de superficie celular u otros agentes de transfección. En todos los casos, los sistemas de liberación controlada se pueden usar para liberar la inmunoadhesina CTLA4-Ig en o cerca de la ubicación deseada de la acción.

Dosificación

Las cantidades de dosificación y frecuencias de administración son, en una realización, seleccionadas para que sean terapéuticamente o profilácticamente eficaces. Como se sabe en la técnica, los ajustes para la degradación de proteínas, administración sistémica frente a la localizada, y la tasa de la síntesis de nuevas proteasas, así como la

edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la interacción de fármacos y la gravedad de la condición, pueden ser necesarios, y serán determinables con la experimentación rutinaria por los expertos en la técnica.

La concentración de la inmunoadhesina CTLA4-Ig terapéuticamente activa en la formulación puede variar de aproximadamente 0,1 a 100 % en peso. En una realización, la concentración de la inmunoadhesina CTLA4-Ig está en el intervalo de 0,003 a 1,0 molar. Con el fin de tratar a un paciente, puede ser administrada una dosis terapéuticamente eficaz de la inmunoadhesina CTLA4-Ig de acuerdo con la invención. Por "dosis terapéuticamente eficaz" en el presente documento se quiere decir una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento y será averiguado por los expertos en la técnica usando técnicas conocidas. Las dosis pueden variar de 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal o más, por ejemplo 0,1, 1, 10 ó 50 mg/kg de peso corporal. En una realización, las dosificaciones varían desde 1 a 10 mg/kg.

En algunas realizaciones, sólo se utiliza una única dosis de la inmunoadhesina CTLA4-Ig. En otras realizaciones, se administran dosis múltiples de la inmunoadhesina CTLA4-Ig. El tiempo transcurrido entre las administraciones puede ser inferior a 1 hora, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1-2 horas, aproximadamente 2-3 horas, aproximadamente 3-4 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 2-4 días, aproximadamente 4-6 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas o más de 2 semanas.

En otras realizaciones las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento se administran en regímenes de dosificación metronómica, ya sea mediante infusión continua o la administración frecuente sin períodos de descanso prolongados. Tal administración metronómica puede implicar la dosificación a intervalos constantes y sin períodos de descanso. Típicamente, tales regímenes abarcan una dosis baja crónica o infusión continua durante un período prolongado de tiempo, por ejemplo 1-2 días, 1-2 semanas, 1-2 meses o hasta 6 meses o más. El uso de dosis más bajas puede minimizar los efectos secundarios y la necesidad de períodos de descanso.

En ciertas realizaciones las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento y uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos se administran cíclicamente al paciente. La terapia cíclica implica la administración de un primer agente en un tiempo, un segundo agente en un segundo tiempo, opcionalmente agentes adicionales en momentos adicionales, opcionalmente, un período de descanso, y luego repetir esta secuencia de administración una o más veces. El número de ciclos es típicamente de 2-10. La terapia cíclica puede reducir el desarrollo de resistencia a uno o más agentes, puede minimizar los efectos secundarios o puede mejorar la eficacia del tratamiento.

Terapias de combinación

Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento se pueden administrar de forma concomitante con uno o más de otros regímenes o agentes terapéuticos. Los regímenes o agentes terapéuticos adicionales pueden ser utilizados para mejorar la eficacia o la seguridad de la inmunoadhesina CTLA4-Ig. Además, los regímenes o agentes terapéuticos adicionales pueden ser usados para tratar la misma enfermedad o una comorbilidad en lugar de alterar la acción de la inmunoadhesina CTLA4-Ig. Por ejemplo, una inmunoadhesina CTLA4-Ig de acuerdo con la invención puede administrarse al paciente junto con quimioterapia, radioterapia o quimioterapia y terapia de radiación.

Los términos "en combinación con" y "co-administración" no se limitan a la administración de dichos agentes profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo. En su lugar, se entiende que la inmunoadhesina CTLA4-Ig descrita en este documento y el otro agente o agentes se administran en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de manera que pueden actuar conjuntamente para proporcionar un beneficio que se incrementa en comparación con el tratamiento sólo, ya sea con la CTLA4 Ig inmunoadhesina descrita en este documento o con el otro agente o agentes. En algunas realizaciones, las inmunoadhesinas CTLA4-Ig descritas en este documento y el otro agente o agentes actúan de forma aditiva y, a veces, sinérgicamente. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto. El médico experto puede determinar empíricamente, o teniendo en cuenta la farmacocinética y los modos de acción de los agentes, la dosis o la dosis de cada agente terapéutico apropiado, así como los tiempos y métodos de administración adecuados.

La inmunoadhesina CTLA4-Ig de acuerdo con la invención puede administrarse en combinación con uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos, incluyendo pero no limitado a agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, antibióticos, agentes antifúngicos, agentes antivirales, citoquinas, agentes inhibidores del crecimiento, agentes anti-hormonales, inhibidores de quinasa, agentes antiangiogénicos, cardioprotectores, agentes inmunoestimuladores, agentes inmunosupresores, agentes que promueven la proliferación de células hematológicas, inhibidores de la angiogénesis, inhibidores de la proteína tirosina quinasa (PTK), otros anticuerpos, fusiones de Fc, o inmunoadhesinas de CTLA4-Ig u otros agentes terapéuticos. Las terapias de la invención se pueden combinar con otras inmunoterapias. Las terapias de la invención se pueden combinar con antagonistas de quimiocinas o citocinas, que incluyen, pero no se limitan a anticuerpos y fusiones de Fc.

Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento se pueden combinar con otros regímenes terapéuticos. Por ejemplo, en una realización, el paciente a ser tratado con una inmunoadhesina CTLA4-Ig descrita en este documento también puede recibir terapia de radiación. La radioterapia se puede administrar según protocolos comúnmente empleados en la técnica que son conocidos por el experto en la materia. Dicha terapia incluye, pero no se limita a radiación de cesio, iridio, yodo o cobalto. La terapia de radiación puede ser una irradiación del cuerpo entero, o puede estar dirigida localmente a un sitio o tejido específico en o sobre el cuerpo, tales como el pulmón, la vejiga o de próstata. Opcionalmente, la radioterapia puede administrarse como una dosis única o como dosis múltiples o secuenciales. El médico experto puede determinar empíricamente la dosis o las dosis de radioterapia útiles en este contexto apropiado. De acuerdo con otro, una inmunoadhesina CTLA4-Ig se describe en este documento y se emplean una o más de otras terapias contra el cáncer para tratar células cancerosas ex vivo. Se contempla que tal tratamiento ex vivo puede ser útil en el trasplante de médula ósea y, en particular, el trasplante autólogo de médula ósea. Por ejemplo, el tratamiento de células o tejido(s) que contiene las células cancerosas con CTLA4-Ig inmunoadhesina y una o más de otras terapias contra el cáncer, como se ha descrito anteriormente, se puede emplear para eliminar, o eliminar sustancialmente, las células cancerosas antes del trasplante en un paciente receptor. Por supuesto, se contempla que las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig descritas en este documento pueden emplearse en combinación con aún otras técnicas terapéuticas, tal como la cirugía.

Mientras que realizaciones particulares de la invención se han descrito anteriormente con fines de ilustración, se apreciará por los expertos en la técnica que numerosas variaciones de los detalles pueden ser hechas sin apartarse de la invención como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Se proporcionan ejemplos a continuación para ilustrar la presente invención. Estos ejemplos no están destinados a limitar la presente invención a ninguna aplicación o teoría de operación particular.

Ejemplo 1. Variantes CTLA4-Ig modificadas que potencian la unión de B7-1 y B7-2

La secuencia de aminoácidos de CTLA4 humano de longitud completa se proporciona en la figura. 1. El dominio extracelular (ECD), que es responsable de la interacción con B7-1 y B7-2 también se proporciona en la Figura 1.

Las inmunoadhesinas (fusiones de Fc) de CTLA4 se pueden construir por unión del ECD (o alguna variante de la ECD) a la región Fc de una IgG. Las regiones Fc de la IgG humana nativa (IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4) se proporcionan en la figura. 2. Aunque la IgG1 Fc proporcionada en la figura 2 contiene el haplotipo 356D/358L, otras formas haplotípicas o alotípicas se pueden utilizar (por ejemplo, 356E/358m). La región Fc en este documento se define como la posición 230 en el extremo C-terminal basado en el esquema de numeración de UE. Abatacept es una inmunoadhesina de CTLA4 ligada a una IgG1 modificada que contiene una sustitución P238S (denominada Fc(IgG1-238S en la Fig. 2). Las CTLA4-Ig-inmunoadhesinas de la invención pueden incluir una serina o prolina en la posición 238 (es decir, las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig pueden comprender 238S o 238P). Otras versiones variantes de las regiones Fc de IgG también se proporcionan en la figura 2, que incluyen una región Fc de IgG2 con cuatro modificaciones IgG1 en la región bisagra inferior (conocidas como Fc(IgG2-233E/234L/235L/236G).

El CTLA4 ECD puede estar unido a una región Fc a través de una variedad de enlazadores. Los enlazadores utilizados en la presente comprenden secuencias de las cadenas constantes de IgG humana, incluyendo el extremo C-terminal del dominio CH1 y bisagra superior. Las secuencias de enlazador ilustrativas basadas en los isotipos de IgG naturales se proporcionan en la figura 3. Pueden ser utilizados enlazadores modificados. Un enlazador ejemplar utilizado en el presente trabajo es un enlazador IgG modificado (por ejemplo, un enlazador basado en IgG1 o IgG2) donde las cisteínas se reemplazan por serinas. Abatacept utiliza un enlazador de IgG1 modificado, sustituciones de cisteína a serina, además de la inserción de una glutamina N-terminal. Ejemplos de tales enlazadores también se proporcionan en la figura 3.

Ejemplos de combinaciones ejemplares de enlazadores y regiones Fc utilizados en el presente estudio se proporcionan en la figura 4. Estos incluyen la región Fc de abatacept, referida como Ig(ab), así como dos fusiones basadas en regiones Fc de IgG2, que se refieren como Ig(G2) e Ig(G2-ELLG), que contienen las cuatro modificaciones IgG1 en la bisagra inferior (233E/234L/235L/236g) integrada en la región Fc de IgG2. Las inmunoadhesinas de CTLA4-Ig ilustrativas se proporcionan en la figura 5. Estas incluyen abatacept, también referida como CTLA4-Ig(ab), una versión basada en Fc de IgG2 de abatacept referida como CTLA4-Ig (G2), y belatacept, que es una versión variante de abatacept con dos sustituciones A29Y y L104E en la porción de CTLA4 que mejoran la afinidad por B7-1 y B7-2.

Con el fin de mejorar la afinidad de CTLA4 humano para B7-1 humana (CD80) y B7-2 (CD86), las variantes de CTLA4 fueron diseñadas utilizando un enfoque racional basado en la estructura. Las estructuras de alta resolución están disponibles de los complejos entre CTLA4 humana y B7-1 humana (Stamper et al, 2001, Nature 410: 608-611) y B7-2 (Schwartz et al, 2001, Nature 410: 604-608). La biblioteca de variantes diseñadas se proporciona de la siguiente manera: A29K, A29N, A29E, A29W, A29F, A29Y, A29H, A29Q, A29R, T30D, T30V, T30A, T30N, T30E, T30H, T30R, E31i, E31M, E31T, E31V, E31D, R33F, R33T, R33M, R33W, R33I, R33Y, R33L, R33E, R33Q, T35E,

T35V, T35M, T35D, T35F, T35Y, A49T, A49F, A49Y, A49W, A49D, A49E, T51V, T51L, T51N, T51H, T51Q, T51E, T51S, T51R, T51D, M53E, M53Q, M53Y, M53W, M53F, M53H, T59V, T59L, T59N, T59Y, T59H, T59Q, T59I, L61D, L61E, L61I, L61F, L61G, L61H, L61K, L61M, L61N, L61P, L61Q, L61R, L61S, L61T, L61V, L61W, L61Y, D63E, S64K, S64R, S64Y, K93D, K93E, K93F, K93H, K93Q, K93R, K93T, K93V, K93W, K93Y, K93N, K93S, E95D, E95Q, E95Y, E95H, E95L, M97F, M97D, M97N, M97I, M97V, Y98F, Y98W, Y102F, Y102W, Y103F, Y103W, Y103H, Y103D, Y103E, Y103N, Y103Q, L104D, L104E, L104V, L104M, L104Y, L104W, L104F, L104H, G105D, G105E, I106E y I106Y.

Los genes que codifican la proteína CTLA4 se sintetizaron comercialmente (Blue Heron Biotechnologies, Bothell, WA), y se subclonaron en el vector de expresión pTT5 de mamífero (Durocher Y, et al, 2002, Nucleic Acids Res 30 [2]: E9), que contiene la región constante humana IgG. Las modificaciones de aminoácidos se construyeron en la parte superior del constructo de abatacept CTLA4-Ig(ab) usando mutagénesis dirigida al sitio que utiliza los métodos de la mutagénesis dirigida al sitio de QuikChange® (Stratagene, La Jolla Calif.). Belatacept CTLA4 (A29Y/L104E)-Ig(ab) también se construyó como control. Todos los ADN se secuenciaron para confirmar la fidelidad de las secuencias. Los plásmidos que contienen los genes CTLA4-Ig se transfectoron en células 293E (Durocher Y, et al, 2002, Nucleic Acids Res 30 [2]: E9; Instituto de Investigación de Biotecnología del Consejo de Investigación Nacional de Canadá) usando lipofectamina™ (Invitrogen, Carlsbad, California) a escala pequeña (3 ml) en formato de placa de 6 pocillos y se cultivaron en medios FreeStyle™ 293 (Invitrogen, Carlsbad, California). Después de 5 días de crecimiento, las proteínas variantes fueron seleccionadas para la unión de la diana directamente a partir de los sobrenadantes. Después de 5 días de crecimiento, las proteínas se purificaron a partir del sobrenadante del cultivo por la proteína A de afinidad utilizando la resina MabSelect™ (GE Healthcare).

Se seleccionaron proteínas de fusión de la variante de CTLA4-Ig Fc según la unión a B7-1 y B7-2 usando resonancia de plasmón de superficie. Las mediciones de la unión se realizaron utilizando un instrumento Biacore™ 3000 (Biacore). Los chips sensores se derivatizaron con mAb anti-His-marcador seguido de la captura de B7-1-Ig o B7-2-Ig (ambos de R & D Systems) a 100 nM y 200 nM, respectivamente durante 1,5 minutos. Se inyectaron proteínas de la variante de CTLA4-Ig y el control en tampón HBS-EP (Biacore) durante 1 min seguido de una disociación de 2 min. Los datos fueron procesados poniendo a cero el tiempo y la respuesta antes de la inyección del receptor restando las señales no específicas apropiadas (respuesta del canal de referencia e inyección del tampón de desarrollo). Los sensogramas de disociación se ajustaron usando el software BIAevaluation para obtener las constantes de velocidad de disociación (desunión o k_d o K_{off}). Los resultados de tres experimentos de unión separados se proporcionan en la Tabla 1, junto con la mejora del plegado o la reducción de la velocidad de disociación para la unión a ambos antígenos.

Tabla 1. Constantes de disociación (k_{off}) para la unión de las variantes CTLA4-Ig a B7-1 y B7-2

Variante	B7-1 (K_{off})	B7-2 (K_{off})	Nivel de cambio de B7-1	Nivel de cambio de B7-2
Experimento 1				
Abatacept (WT)	9,32E-04	5,53E-03	1,00	1,00
Belatacept	2,92E-04	1,30E-03	3,19	4,25
A29K	6,35E-04	1,77E-03	1,47	3,12
T30D	1,03E-03	5,79E-03	0,90	0,96
E31I	2,26E-03	4,27E-03	0,41	1,30
R33F	NB	NB	0,00	0,00
T35E	NB	NB	0,00	0,00
A49T	4,18E-03	1,60E-02	0,22	0,35
T51V	9,52E-04	6,40E-03	0,98	0,86
M53E	1,00E-03	6,20E-03	0,93	0,89
T59V	1,04E-03	5,77E-03	0,90	0,96
L61D	1,02E-03	2,48E-03	0,91	2,23
D63E	1,05E-03	6,51E-03	0,89	0,85
S64K	7,51E-04	6,94E-03	1,24	0,80
K93D	NB	NB	0,00	0,00
E95D	NB	NB	0,00	0,00
M97F	3,33E-03	NB	0,28	0,00
Y98F	1,11E-03	NB	0,84	0,00

Continuación

	Variante	B7-1 (K _{off})	B7-2 (K _{off})	Nivel de cambio de B7-1	Nivel de cambio de B7-2
5	Y102F	3,67E-03	NB	0,25	0,00
	Y103F	1,47E-03	4,35E-03	0,63	1,27
	L104D	3,16E-04	4,62E-03	2,95	1,20
10	G105D	NB	NB	0-00	0,00
	Experimento 2				
15	Abatacept (WT)	1,01E-03	5,19E-03	1,00	1,00
	Belatacept	3,46E-04	1,32E-03	3,19	4,25
	A29K	8,87E-04	2,07E-03	1,14	2,51
	A29N	1,71E-03	5,16E-03	0,59	1,01
20	A29E	9,53E-04	6,04E-03	1,06	0,86
	A29W	8,37E-04	2,38E-03	1,21	2,18
	A29F	1,16E-03	0,0107	0,87	0,49
	A29Y	7,56E-04	3,11E-03	1,34	1,67
25	A29H	6,63E-04	1,92E-03	1,52	2,70
	T30V	1,26E-03	5,80E-03	0,80	0,89
	T30A	1,60E-03	5,39E-03	0,63	0,96
	T30N	1,10E-03	4,10E-03	0,92	1,27
30	T30E	1,01E-03	3,83E-03	1,00	1,36
	T30H	1,18E-03	4,17E-03	0,86	1,24
	T30R	1,34E-03	4,12E-03	0,75	1,26
35	E31M	7,65E-04	NB	1,32	0,00
	E31T	9,65E-04	NB	1,05	0,00
	E31V	1,49E-03	NB	0,68	0,00
	E31D	5,61E-03	0,0243	0,18	0,21
40	R33T	NB	NB	0,00	0,00
	R33M	NB	NB	0,00	0,00
	R33W	NB	NB	0,00	0,00
45	R33I	NB	NB	0,00	0,00
	R33Y	NB	NB	0,00	0,00
	R33L	NB	NB	0,00	0,00
	R33E	NB	NB	0,00	0,00
50	R33Q	9,34E-03	NB	0,11	0,00
	T35V	NB	NB	0,00	0,00
	T35M	NB	NB	0,00	0,00
55	T35D	NB	NB	0,00	0,00
	T35F	NB	NB	0,00	0,00
	T35Y	NB	NB	0,00	0,00
60	A49F	2,49E-03	0,031	0,41	0,17
	A49Y	1,98E-03	0,0379	0,51	0,14
	A49W	3,86E-03	6,38E-03	0,26	0,81
	A49D	3,10E-03	0-0337	0,33	0,15
65	A49E	4,06E-03	NB	0,25	NB
	T51L	1,47E-03	NB	0,69	NB

Continuación

	Variante	B7-1 (K _{off})	B7-2 (K _{off})	Nivel de cambio de B7-1	Nivel de cambio de B7-2
5	T51N	1,85E-03	2,42E-03	0,55	2,14
	T51H	2,81E-03	0,0475	0,36	0,11
	M53Q	1,49E-03	4,71E-03	0,68	1,10
	M53Y	7,01E-04	4,66E-03	1,44	1,11
10	T59L	9,54E-04	5,14E-03	1,06	1,01
	T59N	1,11E-03	5,18E-03	0,91	1,00
	T59Y	1,05E-03	5,29E-03	0,96	0,98
15	T59H	1,15E-03	5,51E-03	0,88	0,94
	T59Q	1,20E-03	5,18E-03	0,84	1,00
	T59I	1,14E-03	5,50E-03	0,89	0,94
20	L61E	1,03E-03	3,48E-03	0,98	1,49
	L61I	1,18E-03	6,30E-03	0,86	0,82
	L61A L61F	8,66E-04 1,04E-03	3,79E-03 5,86E-03	1,17 0,97	1,37 0,89
25	Experimento 3				
	Abatacept (WT)	1,16E-03	5,45E-03	1,00	1,00
	Belatacept	3,98E-04	1,41E-03	2,91	3,87
	L61G	9,66E-04	2,11E-03	1,20	2,58
30	L61H	8,67E-04	4,39E-03	1,34	1,24
	L61K	1,29E-03	2,63E-03	0,90	2,07
	L61M	1,07E-03	5,01E-03	1,08	1,09
35	L61N	1,33E-03	2,68E-03	0,87	2,03
	L61P	8,55E-04	2,79E-03	1,36	1,95
	L61Q	1,87E-04	6,98E-03	6,20	0,78
	L61R	1,06E-03	3,10E-03	1,09	1,76
40	L61S	9,81E-04	3,18E-03	1,18	1,71
	L61T	1,29E-03	3,20E-03	0,90	1,70
	L61V	1,33E-03	6,09E-03	0,87	0,89
45	L61W	9,37E-04	3,74E-03	1,24	1,46
	L61Y	8,76E-04	4,79E-03	1,32	1,14
	S64R	1,08E-03	7,22E-03	1,07	0,75
	S64Y	NB	NB	0,00	0,00
50	K93E	NB	NB	0,00	0,00
	K93F	NB	NB	0,00	0,00
	K93H	NB	NB	0,00	0,00
55	K93Q	4,72E-04	3,68E-03	2,46	1,48
	K93R	3,06E-04	6,06E-03	3,79	0,90
	K93T	NB	NB	0,00	0,00
	K93V	1,67E-04	4,77E-03	6,95	1,14
60	K93W	NB	NB	0,00	0,00
	K93Y	NB	NB	0,00	0,00
	E95Q	NB	NB	0,00	0,00
	E95Y	NB	NB	0,00	0,00
65	E95H	NB	NB	0,00	0,00

Continuación

Variante	B7-1 (K_{off})	B7-2 (K_{off})	Nivel de cambio de B7-1	Nivel de cambio de B7-2
E95L	NB	NB	0,00	0,00
M97D	NB	NB	0,00	0,00
M97N	5,32E-03	NB	0-22	0,00
M97I	5,60E-03	NB	0,21	0,00
M97V	0,0527	NB	0,02	0,00
Y98W	3,25E-03	NB	0,36	0,00
Y102W	NB	NB	0,00	0,00
Y103W	2,21E-03	0,0499	0,52	0,11
Y103H	2,51E-03	4,19E-03	0,46	1,30
Y103D	5,88E-04	2,46E-03	1,97	2,22
Y103E	7,30E-04	9,16E-04	1,59	5,95
Y103N	1,03E-03	7,40E-04	1,13	7,36
Y103Q	4,35E-04	752E-04	2,67	7,25
L104E	4,96E-04	3,08E-03	2,34	1,77
L104V	1,04E-03	375E-03	1,12	1,45
L104M	1,57E-03	4,16E-03	0,74	1,31
L104Y	8,54E-04	5,03E-03	1,36	1,08
L104W L104F	8,42E-04 1,13E-03	5,38E-03 5,85E-03	1,38 1,03	1,01 0,93
L104H	5,94E-04	6,70E-03	1,95	0,81
G105E	NB	NB	0,00	0,00
I106E	7,81E-04	5,35E-03	1,49	1,02
I106Y	2,24E-03	4,29E-03	0,52	1,27
Las constantes de disociación (k_{off}) se presentan en la notación científica E; donde E representa el nivel de cambio de elevado a la potencia de diez; nivel de cambio de B7-1 = K_{off} (abatacept)/ K_{off} (variante) para la unión al B7-1; nivel de cambio de B7-2 = K_{off} (abatacept)/ K_{off} (variante) para la unión a B7-2; NB = No se observó ninguna unión.				

Una representación del nivel de cambio (k_{off}) con relación a abatacept se muestra en la figura 6. Como puede verse en la Tabla 1 y la Fig. 6, un número de sustituciones mostró la disociación más lenta (unión mayor) que la proteína abatacept matriz.

Las variantes con velocidades de disociación para B7-1 y/o B7-2 que eran más lentas que abatacept fueron re-expresadas a mayor escala y se purificaron como se ha descrito anteriormente. Las concentraciones de proteína se determinaron por absorbancia a 280 nM. Las afinidades de unión a B7-1 y B7-2 se midieron con Biacore™ utilizando una serie de concentraciones de proteínas CTLA4-Ig. Todas las variantes de las proteínas CTLA4-Ig se normalizaron a 1 μ M y luego QCD por la unión de proteína A. Un anti-His-chip se generó como anteriormente, y se inmovilizaron B7-1 y B7-2 durante 1 min a 50 nM y 2 min a 100 nM, respectivamente. Las proteínas CTLA4-Ig se diluyeron en una serie de 2 veces a partir de 50, 25, 12,5 y 6,25 nM y se inyectaron durante 1 min, seguido de 2 min de disociación. Los datos cinéticos se ajustaron a un modelo de unión 1:1 (Langmuir) utilizando el software BIAevaluation para proporcionar constantes de velocidad de disociación (k_d o k_{off}), constantes de velocidad de asociación (k_a o k_{on}), y constantes de disociación en equilibrio (K_D o K_D). Las afinidades de unión se proporcionan en la Tabla 2 (B7-1) y en la Tabla 3 (B7-2).

Tabla 2. Afinidades de unión de B7-1 y constantes cinéticas de las variantes de CTLA4-Ig

Variante	k_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)	K_D del nivel de cambio
Abatacept	2,38E+06	1,64E-03	6,91E-10	1,00
Belatacept	2,16E+06	7,75E-04	3,59E-10	1,92
A29K	9,18E+05	1,39E-03	1,52E-09	0,45
A29W	1,97E+06	1,42E-03	7,22E-10	0,96
A29Y	3,07E+06	1,26E-03	4,09E-10	1,69
A29H	2,34E+06	1,08E-03	4,62E-10	1,50

Continuación

Variante	k_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)	K_D del nivel de cambio
T51N	1,95E+06	3,16E-03	1,62E-09	0,43
M53Y	2,64E+06	1,18E-03	4,45E-10	1,55
L61D	3,26E+06	2,04E-03	6,26E-10	1,10
L61E	2,63E+06	1,65E-03	6,25E-10	1,11
L61G	2,76E+06	1,52E-03	5,49E-10	1,26
L61K	2,24E+06	1,85E-03	8,27E-10	0,84
L61N	2,60E+06	2,03E-03	7,82E-10	0,88
K93Q	2,57E+06	8,75E-04	3,40E-10	2,03
K93R	1,16E+06	1,47E-03	1,26E-09	0,55
K93V	1,15E+06	7,54E-04	6,55E-10	1,05
Y103D	2,01E+06	0,0105	5,24E-09	0,13
Y103E	2,45E+06	0,0143	5,85E-09	0,12
Y103N	2,14E+06	0,0188	8,77E-09	0,08
Y103Q	1,83E+06	8,17E-03	4,48E-09	0,15
L104D	5,57E+05	2,11E-03	3,79E-09	0,18
L104E	2,47E+06	8,90E-04	3,60E-10	1,92
L104V	2,54E+06	1,54E-03	6,05E-10	1,14
k_{on} = asociación; K_{off} = disociación; K_D = constante de disociación en el equilibrio; K_D nivel de cambio = K_D (abatacept)/ K_D (variante)				

Tabla 3. Afinidades de unión de B7-2 y constantes cinéticas de las variantes de CTLA4-Ig

Variante	k_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)	K_D del nivel de cambio
Abatacept	3,64E+06	1,66E-02	4,55E-09	1,00
Belatacept	3,35E+06	2,18E-03	6,52E-10	6,98
A29K	1,55E+06	3,96E-03	2,55E-09	1,78
A29W	3,28E+06	4,74E-03	1,44E-09	3,16
A29Y	4,45E+06	6,29E-03	1,41E-09	3,23
A29H	3,35E+06	3,42E-03	1,02E-09	4,46
T51N	2,86E+06	5,07E-03	1,77E-09	2,57
M53Y	3,90E+06	1,17E-02	3,01E-09	1,51
L61D	4,51E+06	1,55E-02	3,44E-09	1,32
L61E	4,18E+06	1,30E-02	3,11E-09	1,46
L61G	3,54E+06	2,05E-02	5,79E-09	0,79
L61K	2,63E+06	2,76E-02	1,05E-08	0,43
L61N	3,45E+06	2,01E-02	5,81E-09	0,78
K93Q	3,80E+06	8,43E-03	2,22E-09	2,05
K93R	1,79E+06	1,71E-02	9,55E-09	0,48
K93V	1,68E+06	1,22E-02	7,30E-09	0,62
Y103D	1,11E+06	9,28E-03	8,38E-09	0,54
Y103E	1,26E+06	8,38E-03	6,64E-09	0,69
Y103N	1,54E+06	0,0143	9,27E-09	0,49
Y103Q	1,53E+06	7,46E-03	4,89E-09	0,93
L104D	8,37E+05	1,75E-02	2,09E-08	0,22
L104E	3,93E+06	6,25E-03	1,59E-09	2,86
L104V	3,47E+06	1,47E-02	4,22E-09	1,08
k_{on} = asociación; K_{off} = disociación; K_D = constante de disociación en el equilibrio; K_D nivel de cambio = K_D (abatacept)/ K_D (variante)				

Sobre la base de los resultados de la selección de sustitución única, fue diseñada una biblioteca de variantes de combinación y variantes adicionales de sustitución única. Las nuevas variantes se enumeran en las tablas 4 y 5. Las variantes se construyeron, expresaron y purificaron como se ha descrito anteriormente. La unión a dianas de B7 se midió como se describe anteriormente y las constantes de velocidad cinética ajustadas y afinidades se proporcionan en la Tabla 4 (B7-1) y la Tabla 5 (B7-2).

Tabla 4. Afinidades de unión de B7-1 y constantes cinéticas de las variantes de CTLA4-Ig

	Variante	k_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)	K_D del nivel de cambio de abatacept
5	Abatacept	2,26E+07	1,32E-03	5,85E-11	1,00
	Belatacept (A29Y/L104E)	2,21E+07	5,57E-04	2,52E-11	2,32
	A29H/T51N/M53Y/L61E/K93Q	2,71E+07	6,11E-04	2,25E-11	2,60
10	A29H/T51N/M53Y/K93Q	1,72E+07	6,87E-04	4,01E-11	1,46
	A29H/T51N/M53Y/L61E	3,20E+07	1,10E-03	3,43E-11	1,71
15	A29H/T51N/L61E/K93Q	3,16E+07	5,18E-04	1,64E-11	3,57
	A29H/M53Y/L61E/ K93Q	3,35E+07	6,09E-04	1,82E-11	3,21
	T51N/M53Y/L61E/ K93Q	2,72E+07	6,90E-04	2,53E-11	2,31
20	A29H/M53Y/K93Q	1,95E+07	6,45E-04	3,31E-11	1,77
	A29H/L61E/K93Q	2,48E+07	6,45E-04	2,60E-11	2,25
	A29H/T51N/L61E	3,53E+07	1,03E-03	2,92E-11	2,00
25	A29H/M53Y/L61E	3,30E+07	7,92E-04	2,40E-11	2,44
	T51N/M53Y/L61E	1,86E+07	1,99E-03	1,07E-10	0,55
	M53Y/L61E/K93Q	2,13E+07	6,85E-04	3,22E-11	1,82
30	T51N/L61E/K93Q	2,14E+07	7,63E-04	3,57E-11	1,64
	A29H/T51N	2,12E+07	1,64E-03	7,75E-11	0,75
35	A29H/M53Y	1,97E+07	7,62E-04	3,87E-11	1,51
	A29H/K93Q	2,26E+07	6,35E-04	2,81E-11	2,08
	T51N/M53Y	1,53E+07	3,56E-03	2,32E-10	0,25
40	T51N/K93Q	1,76 E+07	7,94E-04	4,50E-11	1,30
	T51Q	1,11E+07	0,0137	1,22E-09	0,05
	T51E	1,31E+07	0,0474	3,62E-09	0,02
45	T51S	1,20E+07	1,29E-03	1,07E-10	0,55
	T51R	7,08E+06	0,0181	2,56E-09	0,02
	T51D	9,86E+06	0,0359	3,64E-09	0,02
50	M53W	1,28E+07	2,21E-03	1,72E-10	0,34
	M53F	1,12E+07	1,08E-03	9,57E-11	0,61
55	M53H	1,51E+07	1,48E-03	9,80E-11	0,60
	K93N	NB			
	K93S	1,16E+04	3,42E-04	2,96E-08	0,00
60	A29Q	4,33E+06	2,12E-03	4,91E-10	0,12
	A29R	1,04E+06	2,22E-03	2,13E-09	0,03

k_{on} = asociación; K_{off} = disociación; K_D = constante de disociación en el equilibrio; K_D nivel de cambio = K_D (abatacept)/ K_D (variante); NB = ninguna unión detectada.

Tabla 5. Afinidades de unión de B7-2 y las constantes cinéticas de las variantes de CTLA4-Ig

	Variante	k_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)	K_D nivel de cambio abatacept
5	Abatacept	3,10E+07	0,0135	4,37E-10	1,00
	Belatacept (A29Y/L104E)	3,21E+07	2,18E-03	6,79E-11	6,44
	A29H/T51N/M53Y/L61E/K93Q	3,59E+07	1,20E-03	3,35E-11	13,04
10	A29H/T51N/M53Y/K93Q	3,55E+07	1,31E-03	3,70E-11	11,81
	A29H/T51N/M53Y/L61E	5,11E+07	2,50E-03	4,89E-11	8,94
15	A29H/T51N/L61E/K93Q	4,68E+07	1,07E-03	2,28E-11	19,17
	A29H/M53Y/L61E/K93Q	4,86E+07	1,43E-03	2,94E-11	14,86
	T51N/M53Y/L61E/K93Q	4,75E+07	2,39E-03	5,05E-11	8,65
20	A29H/M53Y/K93Q	3,86E+07	1,34E-03	3,48E-11	12,56
	A29H/L61E/K93Q	4,86E+07	1,53E-03	3,14E-11	13,92
	A29H/T51N/L61E	3,77E+07	2,32E-03	6,14E-11	7,12
25	A29H/M53Y/L61E	3,40E+07	2,47E-03	7,27E-11	6,01
	T51N/M53Y/L61E	4,31E+07	4,64E-03	1,08E-10	4,05
	M53Y/L61E/K93Q	5,38E+07	5,11E-03	9,50E-11	4,60
30	T51N/L61E/K93Q	5,68E+07	2,29E-03	4,04E-11	10,82
	A29H/T51N	3,33E+07	2,56E-03	7,69E-11	5,68
35	A29H/M53Y	3,27E+07	2,41E-03	7,36E-11	5,94
	A29H/K93Q	3,06E+07	1,73E-03	5,65E-11	7,73
	T51N/M53Y	3,37E+07	5,54E-03	1,64E-10	2,66
40	T51N/K93Q	3,50E+07	2,20E-03	6,29E-11	6,95
	T51Q	1,29E+07	0,15	1,16E-08	0,04
	T51E	NB	NB		0,00
45	T51S	1,41E+07	4,59E-03	3,26E-10	1,34
	T51R	1,07E+07	0,0343	3,21E-09	0,14
	T51D	NB	NB		0,00
50	M53W	1,89E+07	7,46E-03	3,95E-10	1,11
	M53F	2,41E+07	9,40E-03	3,90E-10	1,12
	M53H	1,31E+07	0,0132	1,01E-09	0,43
55	K93N	NB	NB		0,00
	K93S	Nota	Nota		0,00
60	A29Q	7,92E+06	0,0164	2,07E-09	0,21
	A29R	1,57E+06	0,0112	7,15E-09	0,06

k_{on} = adsorción; K_{off} = desorción; K_D = constante de disociación en el equilibrio; K_D nivel de cambio = K_D (abatacept)/ K_D (variante); NB = ninguna unión detectada.

Una representación de la KD de CD80 y CD86 para todas las variantes en comparación con abatacept y belatacept se muestra en la figura 7. Un número de las variantes de combinación más fuertemente unidas tanto a B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) en relación con el abatacept CTLA4-Ig de matriz, que proporciona hasta 3,6 veces una mejor unión a B7-1 y hasta 19,2 veces mejor unión al B7-2. La mejor variante de sustitución triple para la unión de B7-2 era T51N/L61E/K93Q (referido como NEQ), que mejoraba la afinidad de B7-2 de 437 pM a 40 pM, y que mejoraba la afinidad de B7-1 de 59 pM a 36 pM. La mejor variante de sustitución cuádruple para la unión de B7-2 fue A29H/T51N/L61E/K93Q (referido como HNEQ), que mejoraba la afinidad de B7-2 de 437 pM a 23 pM, y que mejoraba la afinidad de B7-1 de 59 pM a 16 pM. Un gráfico de los sensogramas de la concentración más alta de CTLA4-Ig para la variante de HNEQ en comparación con abatacept y belatacept se muestra en la figura 8. Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas de la variante de CTLA4 y la variante de CTLA4-Ig se proporcionan en la figura 9.

Ejemplo 2. Las variantes de CTLA4-Ig modificadas tienen una mayor actividad inhibidora de células T in vitro

Las proteínas de la variante de CTLA4-Ig de NEQ y HNEQ se ensayaron en un ensayo basado en células respecto a su capacidad de inhibir la proliferación de células T. Abatacept, belatacept y un anticuerpo IgG1 anti-RSV sin especificidad para B7-1 o B7-2 (control negativo) se usaron como controles. En este ensayo, la activación de células T y la proliferación se estimularon utilizando el anticuerpo anti-CD3 OKT3 y la fusión B7-2 Fc recombinante (R & D Systems). Se recubrieron placas de cultivo de tejidos en forma de U con 2 μ g/ml de CD86-Fc y 0,5 μ g/ml de anti-OKT3 en PBS a 4 °C durante la noche. Las placas se lavaron 3 veces con PBS. Se purificaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a partir de leucófóresis de voluntarios sanos anónimos (HemaCare, Vannuys, Calif.) usando gradientes de densidad de Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences, Newark, N.J.). Las células T se aislaron del PBMC utilizando un kit de EasySep® de enriquecimiento de células T humanas (StemCell Technologies) y las células T se marcaron con CFSE (10 μ M). Se añadieron variantes de proteínas de CTLA4-Ig o controles en diluciones de 4 veces sobre 8 concentraciones, siendo la concentración más alta 50 μ g/ml. Las muestras se analizaron por duplicado. Se añadieron ~500.000 células T a la placa recubierta y se incubaron durante 4 días a 37 °C. Las condiciones de control se llevaron a cabo con células en pocillos recubiertos con CD86-Fc/OKT3 y células solamente (sin recubrimiento). Después de 4 días de cultivo, se analizaron las muestras según la tinción con FITC (CFSE) utilizando un FACSCanto2™. Los datos en la figura 10 muestran que las variantes de CTLA4-Ig probadas T51N/L61E/K93Q y A29H/T51N/L61E/K93Q son superiores al CTLA4-Ig abatacept matriz, en consonancia con sus mejores afinidades de B7-1 y B7-2. Por otra parte, tanto la variante T51N/L61E/K93Q como A29H/T51N/L61E/K93Q mostró una mayor actividad inhibitoria en relación con belatacept, en consonancia con su mayor afinidad para B7-2.

Ejemplo 3. Inmunoadhesinas de CTLA4-Ig con una mayor unión a FcRn para la semivida in vivo prolongada

La región Fc de las proteínas de CTLA4-Ig fue diseñada para mejorar la afinidad para el receptor de Fc neonatal FcRn, con el objetivo de mejorar en el suero la semivida in vivo. Las variantes de Fc que mejoran la unión de FcRn y que pueden proporcionar propiedades farmacocinéticas mejoradas incluyen, pero no se limitan, a las sustituciones en las posiciones 259, 307, 308, 311, 378, 426, 428, 434 y 436 incluyendo, pero no limitado a, por ejemplo, 259I, 307Q, 308F, 311I, 311V, 378V, 378T, 426V, 428L, 434S, 434H, 434F, 434Y, 434M, 436I y 436V (documento USSN 12/341.769, presentada el 22 de diciembre de 2008).

Otras variantes que aumentan la unión de Fc a FcRn incluyen, pero no están limitadas, a: 250E, 250Q, 428L, 428F, 250Q/428L (Hinton et al, 2004, J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6216, Hinton et al. 2006 Journal of Immunology 176: 346-356), 256A, 272A, 286A, 305A, 307A, 311A, 312A, 376A, 378Q, 380A, 382A, 434A (Shields et al., Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 (9): 6591-6604),

252F, 252T, 252Y, 252W, 254T, 256S, 256R, 256Q, 256E, 256D, 256T, 309P, 311S, 433R, 433S, 433I, 433P, 433Q, 434H, 434F, 434Y, 252Y/254T/256E, 433K/434F/436H, y 308T/309P/311S (Dall'Acqua et al. Journal of Immunology, 2002, 169: 5171-5180, Dall'Acqua et al., 2006, The Journal of Biological Chemistry 281: 23514-23524).

Fueron diseñadas sustituciones M428L y N434S que proporcionaban una mayor afinidad de FcRn y con semivida prolongada en la región Fc de CTLA4-Ig (ab) de abatacept, CTLA4-Ig (G2), belatacept, y versiones de Ig(G2-ELLG) de las variantes CTLA4 (HNEQ) y CTLA4 (NEQ). Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas de la variante de CTLA4-Ig se proporcionan en la figura 11.

Se construyeron proteínas de la variante de CTLA4-Ig, se expresaron y purificaron como se ha descrito anteriormente. La afinidad de estas variantes a FcRn a pH 6,0 se midió usando Biacore™ con un formato de analito de FcRn de captura de inmunoadhesina mediada por antígeno/humano utilizando un instrumento Biacore 3000™ (Biacore™). B7-1 y B7-2 fueron inmovilizados en el chip CM5 a una densidad de 6.500 y 8.400 UR, respectivamente, utilizando el método de acoplamiento de amina estándar. Los ligandos se diluyeron en tampón de acetato pH 4,0 a 200 nM cada uno. La superficie se activó durante 4 min con hidrócloruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) + N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) de resistencia completa, seguido por la inyección del ligando de fusión B7-1 o B7-2 Fc (R&D Systems) durante 15 min a 2 μ l/min. Finalmente, la superficie fue bloqueada con etanolamina. La captura de las proteínas CTLA4-Ig se llevó a cabo en tampón de

fosfato pH 6,0 tanto en 20 nM (WT IgG1 Fc) o 10 nM (M428L/N434S variante Fc) durante 2 minutos para lograr UR de 1500 ó 700, respectivamente. A continuación, se inyectaron soluciones de analitos FcRn humanas a concentraciones de 500, 250 y 125 nM a las concentraciones indicadas seguido de la regeneración de la superficie B7 con tampón acetato de pH 4,0 + NaCl 500 mM antes del siguiente ciclo. Debido a la fusión de Fc presente en B7, hubo una alta línea de fondo de la unión de hFcRn directamente a la superficie, por lo tanto, se inyectó una serie de concentraciones de hFcRn en la superficie no inmovilizada (vacío) para restar manualmente este fondo durante el análisis Biaevaluation. Después de la resta de la línea de fondo/la desviación y la puesta a cero, los sensogramas se ajustaron globalmente a un modelo de unión de Langmuir 1:1 usando el software Biaevaluation (Biacore™).

Los sensogramas representativos para la unión de abatacept CTLA4-Ig(ab) y la versión de Fc modificada CTLA4-Ig(ab-LS) (LS = 428L/434S) se muestran en la figura 12. Se proporcionan afinidades ajustadas para la unión a FcRn por abatacept CTLA4-Ig (ab) y CTLA4-Ig (G2), junto con versiones de Fc modificadas CTLA4-Ig(ab-LS) y CTLA4-Ig (G2-LS) en la Tabla 6 y se representan en la figura. 13. Los resultados demuestran la afinidad mejorada para FcRn de las versiones Fc modificadas de las proteínas de CTLA4-Ig y, por lo tanto, el potencial de las versiones de la variante Fc para mayor semivida in vivo.

Tabla 6. Las afinidades de unión de proteínas CTLA4-Ig a FcRn humano a pH 6,0

Inmunoadhesina	K _D (μM)	Nivel de cambio
Abatacept CTLA4-Ig (ab)	3,4	1,0
CTLA4-Ig (ab-428L/434S)	0,28	12
CTLA4-Ig (G2)	5,0	1,0
CTLA4-Ig (G2-428L/434S)	0,23	22

Ejemplo 4. Inmunoadhesinas CTLA4-Ig con una mayor actividad inhibitoria de células T en reacciones de linfocitos mixtos

Se ensayaron variantes de CTLA4-Ig de selección con una mayor unión a FcRn para determinar su actividad inhibitoria de células T. Se ensayaron proteínas CTLA4-Ig en el ensayo basado en células descrito anteriormente, donde la proliferación de células T se estimuló utilizando el anticuerpo anti-CD3 y la fusión de Fc B7-2. Los datos en la figura 14 muestran la potente y superior actividad inhibitoria de las variantes de CTLA4 de afinidad mejorada de B7 (T51N/L61E/K93Q y A29H/T51N/L61E/K93Q) acopladas con las variantes de Fc que mejoran la afinidad de FcRn (M428L/N434S).

Las actividades inhibitorias de las células T de las variantes de CTLA4-Ig se midieron más probándolas en una reacción mixta de linfocitos (también conocida como una reacción mixta de leucocitos o MLR). La MLR es un método in vitro para el ensayo de la proliferación celular de T auxiliares (TH) y para la generación de una población de linfocitos T citotóxicos (CTL). Cuando se cultivan juntos linfocitos alogénicos (diferentes haplotipos MHC), las poblaciones de células TH se expanden, seguido por la expansión de una población de CTL. Las rutas coestimuladoras MHC/TCR y B7/CD28 son críticas para la reacción alogénica. La secreción de interleucina-2 (IL-2) se utiliza para controlar la activación de células T. En dos experimentos separados, dos conjuntos diferentes de PBMC humanas se purificaron de leucoféresis de dos voluntarios sanos anónimos diferentes (HemaCare, Vannuys, Calif.) usando gradientes de densidad de Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences, Newark, N.J.). Se mezclaron PBMC a ~1,2 x 10E6 por pocillo cada uno con 300 μl de RPMI1640/FBS al 10 %. En uno de los dos experimentos, las PBMC de donantes 2336 y 3070 se mezclaron, en el otro experimento se mezclaron las PBMC de los donantes 3070 y 3995. Se prepararon los controles negativos de las proteínas CTLA4-Ig e IgG1 anti-RSV en una serie de diluciones 10 punto 4 x y se añadieron a las concentraciones finales indicadas a las PBMC mixtas. Las PBMC solas (por separado) fueron también ensayadas como controles. Las placas se incubaron durante 6 días. Se recogió el sobrenadante y la concentración de IL-2 se midió usando un kit de ELISA de IL-2 LegendMax™ (BioLegend). Los resultados de los ensayos se proporcionan en la figura 15.

Los datos en la figura 15 apoyan la potente actividad inhibitoria de las variantes de CTLA4-Ig, así como su superioridad para Orenicia® (abatacept). Sorprendentemente, la variante NEQ superó a la variante HNEQ, a pesar de la mayor afinidad de la variante de HNEQ tanto para B7-1 como B7-2 (Tablas 4 y 5). La variante HNEQ mejora la afinidad de B7-1 3,6 veces y la afinidad B7-2 19,2 veces en relación con abatacept, mientras que la variante NEQ mejora la afinidad de B7-1 1,6 veces y la afinidad de B7-2 10,8 veces en relación con abatacept. La mayor actividad inhibitoria de las células T de la variante NEQ puede reflejar las diferentes funciones biológicas de B7-1 y B7-2 en la respuesta inmunitaria. Un trabajo reciente ha demostrado que B7-2 es el ligando dominante de CD28, mientras que B7-1 es el ligando dominante de CTLA4, y, además, que B7-2 no es capaz de reclutar CTLA-4 a la sinapsis inmunitaria (Collins et al., 2002, Immunity 17: 201-210; Jansson et al, 2005, J Immunol 175: 1575-85). Debido al papel del CTLA4 endógeno en la regulación negativa de las células T (Alegre et al, 2001, Nat Rev Immunol. 1: 220-8), así como a su papel en las células T reguladoras (Treg-supresión mediada de la respuesta inmunitaria (Sakaguchi et al, 2009, International Immunology 21[10]:1105-1111), el aumento de la afinidad para B7-1, que se acopla preferentemente al CTLA4 endógeno, puede inhibir el inhibidor natural, promoviendo así la activación de

células T. En este sentido, para los propósitos terapéuticos B7-2 puede ser el ligando más importante para inhibir, por consiguiente, la variante óptima para la optimización de CTLA4 puede ser mejor selectiva de la afinidad a B7-2 en relación con B7-1. Las sustituciones que mejoran de forma selectiva la afinidad de B7-2 con relación a B7-1 incluyen, por ejemplo, A29H, A29K, T51N, L61E y Y103Q. Se observa que, para fines experimentales, poniendo a prueba esta hipótesis de selectividad se puede sacar beneficio de las variantes que proporcionan la selectividad opuesta, es decir, la unión mejorada a B7-1 en relación con B7-2, incluyendo, por ejemplo, K93V, L61Q y L104H. En general, los resultados indican que la variante de combinación de NEQ T51N/L61E/K93Q es la variante óptima con respecto a la selectividad, proporcionando una mejora de 10,8 veces de la afinidad respecto a B7-2, pero sólo marginalmente (1,6 veces) una mayor unión a B7-1. Este perfil de afinidad y selectividad es superior a belatacept, lo que mejora la afinidad solamente de 6,5 a 7 veces respecto a B7-2 y 2,3 veces respecto a B7-1 (Tablas 2-5).

Ejemplo 5. Actividad in vivo de nuevas inmunoadhesinas CTLA4-Ig

Un experimento in vivo en ratones se llevó a cabo para probar la actividad de las variantes de CTLA4-Ig modificadas. La capacidad de las proteínas de CTLA4-Ig para inhibir una respuesta inmunitaria humana al tétano se llevó a cabo en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) injertados con leucocitos de sangre periférica humana (PBL). Fueron elegidos ratones SCID como el modelo animal para este estudio ya que estos ratones son inmunodeprimidos y aceptan el injerto de PBMC humano. Se expresaron proteínas CTLA4-Ig para estudios in vivo en células CHO (Instituto de Investigación de Biotecnología, Consejo de Investigación Nacional de Canadá) y se purificaron como se ha descrito anteriormente.

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de un leukopak™ extraído de un donante aleatorio (Hemacare, Van Nuys, California.). Fueron purificadas las PBMC por centrifugación en un gradiente de densidad Ficoll (Ficoll-Paque™ Plus, GE Healthcare), se resuspendieron en RPMI 1640 (Mediatech) y se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 3×10^7 células. Un día antes de la inyección de PBMC, los ratones fueron inyectados i.p. con 100 μ l de GM anti-asialo (Wako, Richmond, Va.) para agotar las células NK murinas. El día siguiente, los ratones fueron inyectados i.p. con 3×10^7 PBMC en un volumen de 0,5 ml. Se inyectaron a un total de aproximadamente 70 ratones. El día de la inyección de las células se define como el día 0 del estudio. Todos los animales fueron inyectados con PBMC el mismo día.

Después de la inyección de PBMC, los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos y se pesaron. En el día 7 después de la inyección de PBMC, se recogió sangre de todos los ratones mediante punción del seno/plexo (OSP) retro-orbital para la determinación de los niveles de IgG humana (IgG humana ELISA, Zeptometrix, Buffalo, Nueva York). El mismo día después de la extracción de sangre (día 7), se inyectaron i.p. a los ratones 1 mg/kg del artículo de prueba o PBS como control negativo. Los ratones continuaron recibiendo inyecciones cada 3 ó 4 días durante todo el estudio. Los artículos de ensayo se inyectaron en una base de mg/kg utilizando la medición más reciente de peso corporal. El día 9, los ratones fueron inyectados i.p. con 15 μ g del toxoide tetánico (List Biological Labs, Campbell, CA, N° de catálogo 191B) o con PBS. El día 21 (12 días después de la vacunación con antígeno), se recogió sangre de todos los ratones para la determinación de IgG humana e IgG anti-tétano.

Se recogieron muestras de sangre (25-50 μ L) los días 7 y 21 post-injerto de PBMC utilizando sinusal retro-orbital/plexo (OSP) (con anestesia tópica de proparacaína e isoflurano inhalante). Las muestras de sangre se transfirieron a tubos separadores de suero, se dejó reposar durante 30 minutos-1 hora para permitir que la sangre se coagulara y luego se centrifugaron (3500 rpm durante 30 minutos). El suero resultante se transfirió a tubos de polipropileno marcados con el número de estudio, el número del animal, la fecha, el momento de la recogida. Las muestras de suero se almacenaron a -20 °C. La concentración en suero del anticuerpo anti-tétanos (anti-TT IgG) se midió usando un kit de ELISA anti-tétanos estándar (IBL-America).

Los resultados en la figura 16 demuestran la actividad de la afinidad mejorada de la variante NEQ inmunoadhesina CTLA4-Ig en relación con PBS+tétanos solo. Además, los datos muestran que la variante NEQ tenía una actividad inhibidora más potente que el CTLA4-Ig abatept matriz. Estos datos apoyan el uso de las variantes de CTLA4-Ig descritas en este documento para el tratamiento de trastornos relacionados con la inmunidad.

La descripción incluye además el objeto en cuestión de las reivindicaciones del documento WO2011103584 de las que se deriva esta solicitud, cuyo contenido se reproduce a continuación como párrafos numerados.

Párrafo 1. Una inmunoadhesina que comprende un primer dominio que comprende una variante de CTLA4 en comparación con la SEQ ID NO:6 y un segundo dominio que comprende una región Fc de IgG, en donde dicha variante de CTLA4 comprende una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en T51N, A29H, M53Y, L61E y K93Q, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1, B7-2, o ambos B7-1 y B7-2.

Párrafo 2. Una inmunoadhesina de acuerdo con el párrafo 1, en donde dicha variante comprende una combinación de sustituciones seleccionada del grupo que consiste en A29H/K93Q, A29H/M53Y, A29H/T51 N, T51N/K93Q, T51 N/M53Y, A29H/L61E/K93Q, A29H/M53Y/K93Q, A29H/M53Y/L61E, A29H/T51N/L61E, M53Y/L61E/K93Q,

T51N/L61E/K93Q, T51N/M53Y/L61E, A29H/M53Y/L61E/K93Q, A29H/T51 N/L61E/K93Q, A29H/T51N/M53Y/K93Q, A29H/T51N/M53Y/L61E, T51N/M53Y/L61E/K93Q y A29H/T51N/M53Y/L61E/K93Q.

5 Párrafo 3. Una inmunoadhesina de acuerdo con el párrafo 2, en donde dicha variante comprende una combinación de sustituciones seleccionada del grupo que consiste en T51N/L61E/K93Q y A29H/T51N/L61E/K93Q.

10 Párrafo 4. Una inmunoadhesina de acuerdo con el párrafo 2, en donde dicha variante comprende una combinación de sustituciones seleccionada del grupo que consiste en T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N/L61E/K93Q, A29H/T51N, T51N/M53Y y T51N/M53Y/L61E.

10 Párrafo 5. Una inmunoadhesina de acuerdo con el párrafo 1, en donde dicha variante de la proteína CTLA4 tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:31 o SEQ ID NO:32.

15 Párrafo 6. Una inmunoadhesina de acuerdo con el párrafo 1, en donde dicha inmunoadhesina tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37 o SEQ ID NO:38.

20 Párrafo 7. Un método de tratamiento de un paciente con un trastorno relacionado con la inmunidad, en donde dicho tratamiento comprende la etapa de administrar a dicho paciente una inmunoadhesina que comprende una secuencia de aminoácidos correspondiente a SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:36, SEQ ID NO:37 o SEQ ID NO:38.

25 Párrafo 8. Un método de tratamiento de acuerdo con el párrafo 7, en donde dicho trastorno relacionado con la inmunidad se selecciona del grupo que consiste en la enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico (LES), la nefritis lúpica, artritis psoriásica, psoriasis, artritis reumatoide, colitis ulcerosa y rechazo de trasplantes.

30 Párrafo 9. Una inmunoadhesina que comprende un primer dominio que comprende una variante de CTLA4 en comparación con la SEQ ID NO:6 y un segundo dominio que comprende una región Fc de IgG, en donde dicha variante comprende al menos una modificación de aminoácido en una CTLA4 nativa, en donde dicha modificación es una sustitución en una posición de CTLA4 seleccionada del grupo que consiste en 51 y 61, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1, B7-2, o ambos B7-1 y B7-2.

Párrafo 10. Un ácido nucleico que codifica para la inmunoadhesina del párrafo 1.

35 Párrafo 11. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico del párrafo 10.

Párrafo 12. Un método de preparación de una inmunoadhesina que comprende el cultivo de la célula huésped del párrafo 11 bajo condiciones en donde se produce dicha inmunoadhesina

REIVINDICACIONES

1. Una inmunoadhesina que comprende:
 - 5 un primer dominio que comprende una CTLA4 de SEQ ID NO:6 o una variante de CTLA4 en comparación con la SEQ ID NO: 6, en donde dicha variante de CTLA4 comprende al menos una modificación de aminoácido en una CTLA4 nativa, en donde dicha modificación es una sustitución en la posición T51 de la CTLA4, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1, B7-2, o ambas. B7-1 y B7-2; y
 - 10 un segundo dominio que comprende una región variante Fc de un polipéptido Fc de tipo salvaje, dicha variante Fc que comprende las sustituciones de aminoácidos en la región Fc de dicho polipéptido Fc de tipo salvaje de M428L y N434S, en donde la numeración es de acuerdo con el índice EU como en Kabat.
2. Una inmunoadhesina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha variante de CTLA4 comprende una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en T51N, A29H, M53Y, L61E y K93Q, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1, B7-2, o B7-1 y B7-2 y en donde dicha variante comprende una combinación de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en A29H/T51N, T51N/M53Y, A29H/T51N/L61E, T51N/L61E/K93Q, T51N/M53Y/L61E, A29H/T51N/L61E/K93Q, T51N/M53Y/L61E/K93Q y A29H/T51N/M53Y/L61E/K93Q.
3. La inmunoadhesina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha variante proporciona una mayor unión a B7-1 y a B7-2.
4. La inmunoadhesina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha variante comprende la combinación de sustituciones A29H/T51N.
5. La inmunoadhesina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha variante comprende la combinación de sustituciones T51N/M53Y.
6. La inmunoadhesina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha variante comprende la combinación de sustituciones T51N/M53Y/L61E.
7. La inmunoadhesina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha variante comprende la combinación de sustituciones T51N/L61E/K93Q.
8. La inmunoadhesina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicha variante comprende la combinación de sustituciones A29H/T51N/L61E/K93Q.
9. Una inmunoadhesina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de un paciente con un trastorno relacionado con la inmunidad.
10. Una inmunoadhesina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho trastorno relacionado con la inmunidad se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Crohn, lupus eritematoso sistémico (LES), nefritis lúpica, artritis psoriásica, psoriasis, artritis reumatoide, colitis ulcerosa y rechazo de trasplantes.
11. Un ácido nucleico que codifica la inmunoadhesina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
12. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 11.
13. Un método de preparación de una inmunoadhesina que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 12 bajo las condiciones, en donde se produce dicha inmunoadhesina.

Figura 1

CTLA4 humana (SEQ ID NO: 5)

MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYAS
PGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMD
TGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLS
KMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN

ECD CTLA4 humano (Numeración secuencial 1-124) (SEQ ID NO: 6)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDS
D

Belatacept CTLA4(29Y/104E) (Numeración secuencial 1-124) (SEQ ID NO: 7)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYEGINGTQIYVIDPEPCPDS
D

Secuencia consenso (Numeración secuencial 1-124) (SEQ ID NO: 8)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGK(A/H)TEVRVTVLRQADSQVTEVCAA(T/N)Y(M/Y)
MGNELTF(L/E)DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYIC(K/Q)VELMYPPPYLIGINGT
QIYVIDPEPCPDS

Los aminoácidos en negrita significan que cualquier resto de aminoácido puede encontrarse en la posición

Figura 2

Fc(IgG1) (Numeración EU 230-447) (SEQ ID NO: 9)

PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc(IgG2) (Numeración EU 230-447) (SEQ ID NO: 10)

PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSGDSFFLYSKLTV
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc(IgG3) (Numeración EU 230-447) (SEQ ID NO: 11)

PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNTTPMLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

Fc(IgG4) (Numeración EU 230-447) (SEQ ID NO: 12)

PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSRLTV
DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

Fc(IgG1-238S) (aka abatacept Fc) (Numeración EU 230-447) (SEQ ID NO: 13)

PAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc(IgG2-233E/234L/235L/236G) (Numeración EU 230-447) (SEQ ID NO: 14)

PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Fc(IgG2-233E/234L/235L/236G/238S) (Numeración EU 230-447) (SEQ ID NO:15)

PAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK
PREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSGDSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 3

Enlaz. (IgG1) (Numeración EU 216-229) (SEQ ID NO: 16)

EPKSCDKTHTCPPC

Enlaz. (IgG2) (Numeración EU 216-229) (SEQ ID NO: 17)

ERKCCVECPPC

Enlaz. (IgG3) (Numeración EU 216-229) (SEQ ID NO: 18)

ELKTPGLDTHHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRC

Enlaz. (IgG4) (Numeración EU 216-229) (SEQ ID NO: 19)

ESKYGPPCPSC

Enlaz. (IgG1-220S/226S/229S) (Numeración EU 216-229) (SEQ ID NO: 20)

EPKSSDKTHTSPPS

Enlaz. (IgG2-219S/220S/226S/229S) (SEQ ID NO: 21)

ERKSSVESPPS

Enlaz. (Q-IgG1-220S/226S/229S) (aka abatacept enlaz.) (SEQ ID NO: 22)

QEPKSSDKTHTSPPS

Enlaz. (Q-IgG2-219S/220S/226S/229S) (SEQ ID NO: 23)

QERKSSVESPPS

Figura 4

Ig(ab) [Enlaz. (Q-IgG1-220S/226S/229S)+Fc(IgG1-238S)] (SEQ ID NO: 24)

QEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ig(ab-238P) [Enlaz. (Q-IgG1-220S/226S/229S)+Fc(IgG1)] (SEQ ID NO: 25)

QEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ig(G2) [Enlaz. (Q-IgG2-219S/220S/226S/229S)+Fc(IgG2)] (SEQ ID NO: 26)

QERKSSVESPPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Ig(G2-ELLG) [Enlaz. (Q-IgG1-220S/226S/229S)+Fc(IgG2-233E/234L/235L/236G)] (SEQ ID NO: 27)

QEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP
MLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 5

Abatacept CTLA4-Ig(ab) (XENP8420) (SEQ ID NO: 28)

MHVAQPAVVLAASSRGIAFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDS
DQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

CTLA4-Ig(G2) (XENP8445) (SEQ ID NO: 29)

MHVAQPAVVLAASSRGIAFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDS
DQERKSSVESPPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPMLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Belatacept CTLA4(29Y/104E)-Ig(ab) (XENP8448) (SEQ ID NO: 30)

MHVAQPAVVLAASSRGIAFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYEGINGTQIYVIDPEPCPDS
DQEPKSSDKTHTSPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 6

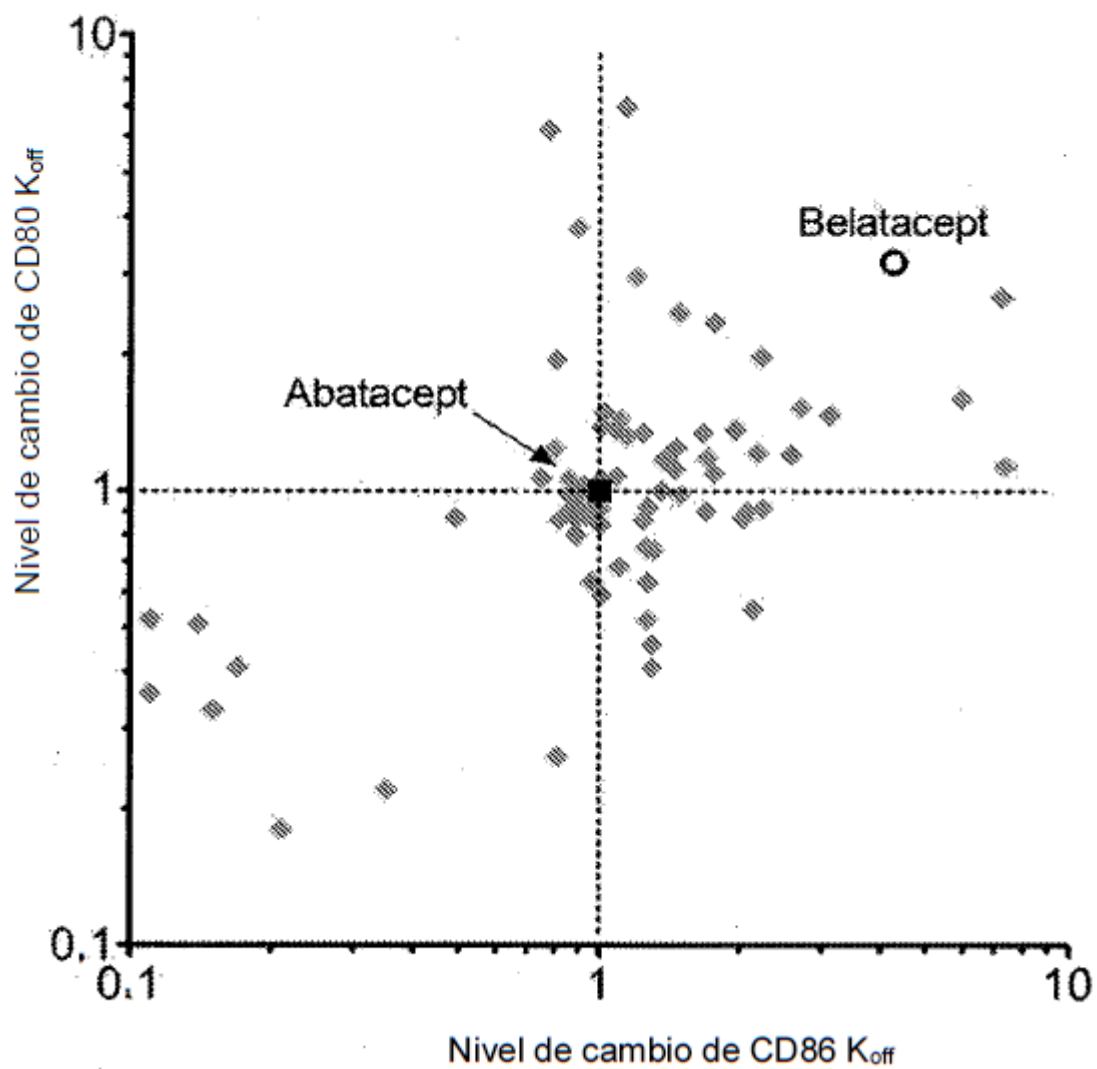


Figura 7

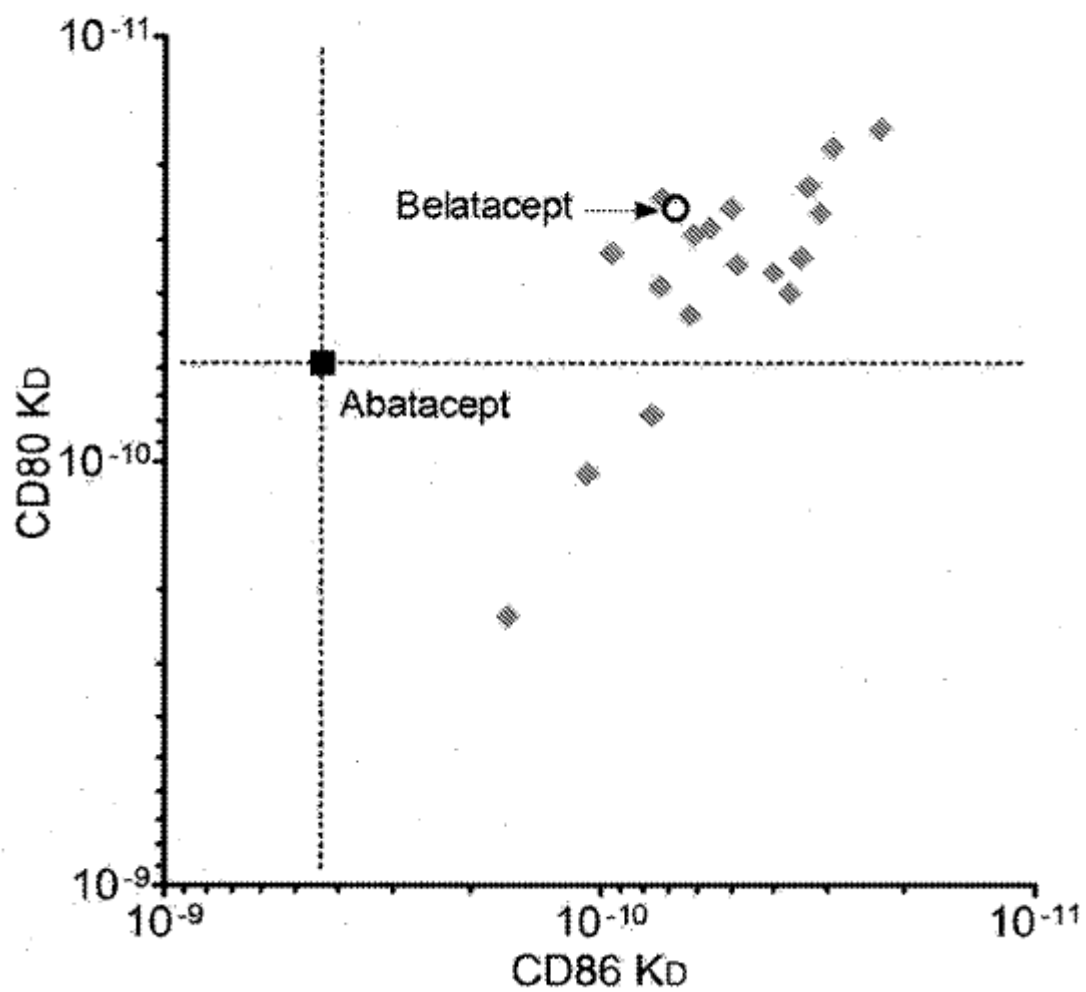


Figura 8

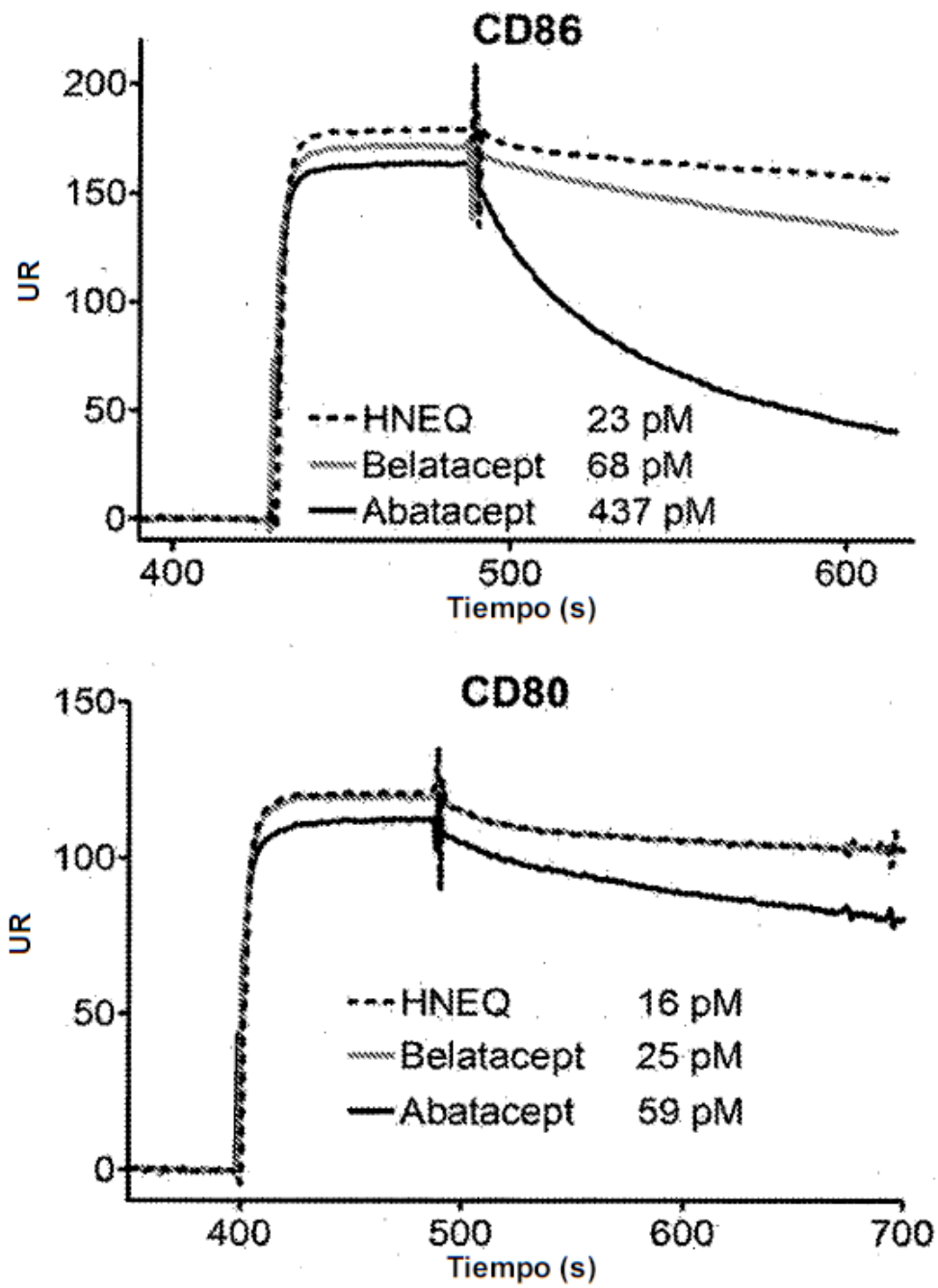


Figura 9

CTLA4(HNEQ) (29H/51N/61E/93Q) (H1.135) (SEQ ID NO: 31)

MHVAQPAVVCLASSRGIASFVCEYASPGKHTEVRVTVLRQADSQVTEVCAANYMMGNELTF
EDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICQVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPD
SD

CTLA4(NEQ) (51N/61E/93Q) (H1.144) (SEQ ID NO: 32)

MHVAQPAVVCLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAANYMMGNELTF
EDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICQVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPD
SD

CTLA4(HNEQ)-Ig(ab) (XENP9360) (SEQ ID NO: 33)

MHVAQPAVVCLASSRGIASFVCEYASPGKHTEVRVTVLRQADSQVTEVCAANYMMGNELTF
EDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICQVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPD
SDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

CTLA4(NEQ)-Ig(ab) (XENP9369) (SEQ ID NO: 34)

MHVAQPAVVCLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAANYMMGNELTF
EDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICQVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPD
SDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 10

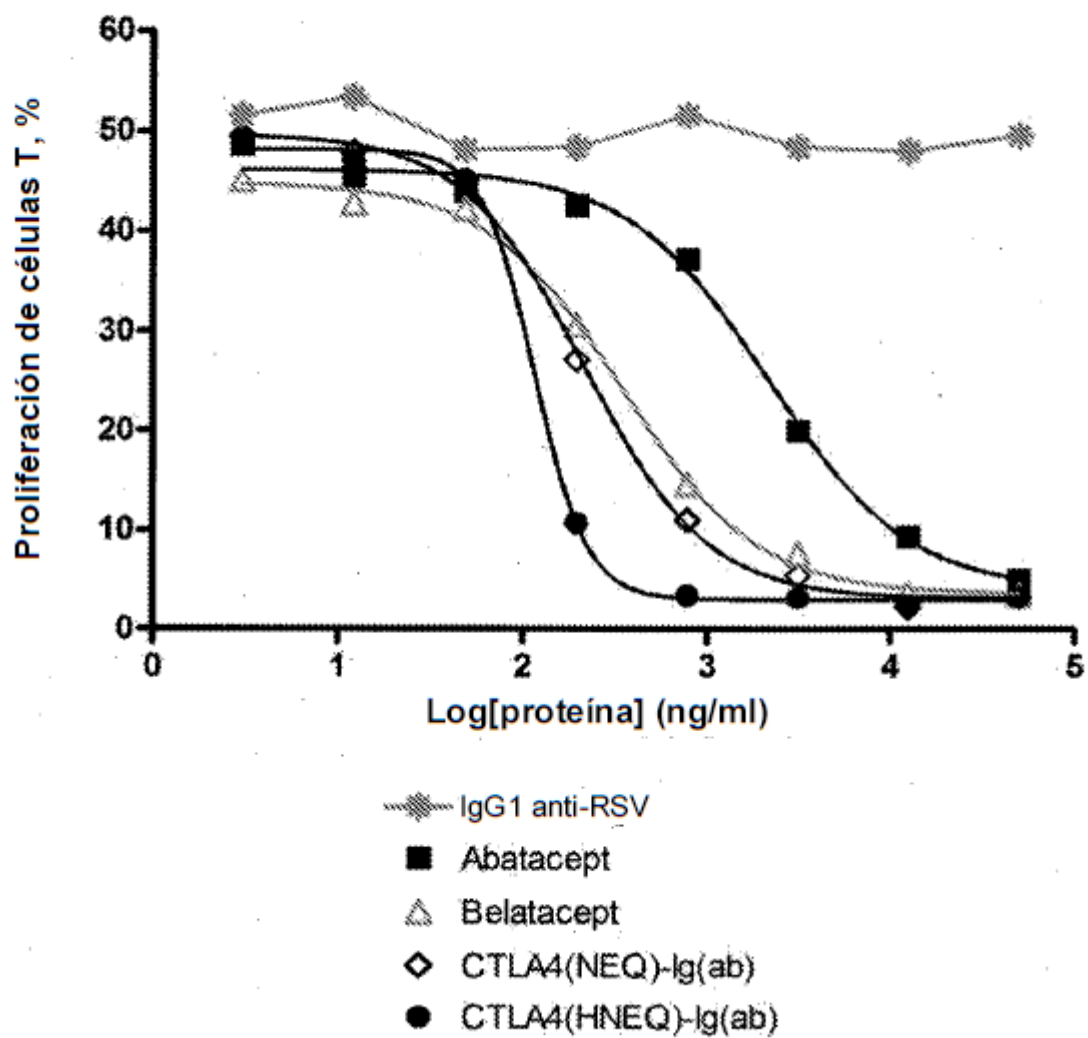


Figura 11

Abatacept CTLA4-Ig(ab-428L/434S) (XENP8441) (SEQ ID NO: 35)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDS
DQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

CTLA4-Ig(G2-428L/434S) (XENP8447) (SEQ ID NO: 36)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTF
LDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDS
DQERKSSVESPPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISK
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPMLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

CTLA4(HNEQ)-Ig(G2-ELLG-428L/434S) (XENP9523) (SEQ ID NO: 37)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKHTEVRVTVLRQADSQVTEVCAANYMMGNELTF
EDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICQVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPD
SDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
PPMLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

CTLA4(NEQ)-Ig(G2-ELLG-428L/434S) (XENP9524) (SEQ ID NO: 38)

MHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAANYMMGNELTF
EDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICQVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPD
SDQEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
PPMLDSDGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVLHEALHSHYTQKSLSLSPGK

Figura 12

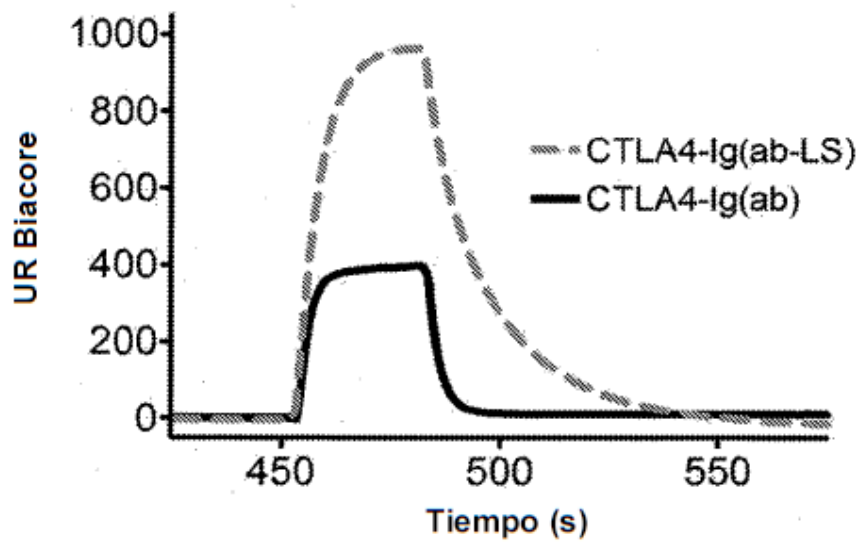


Figura 13

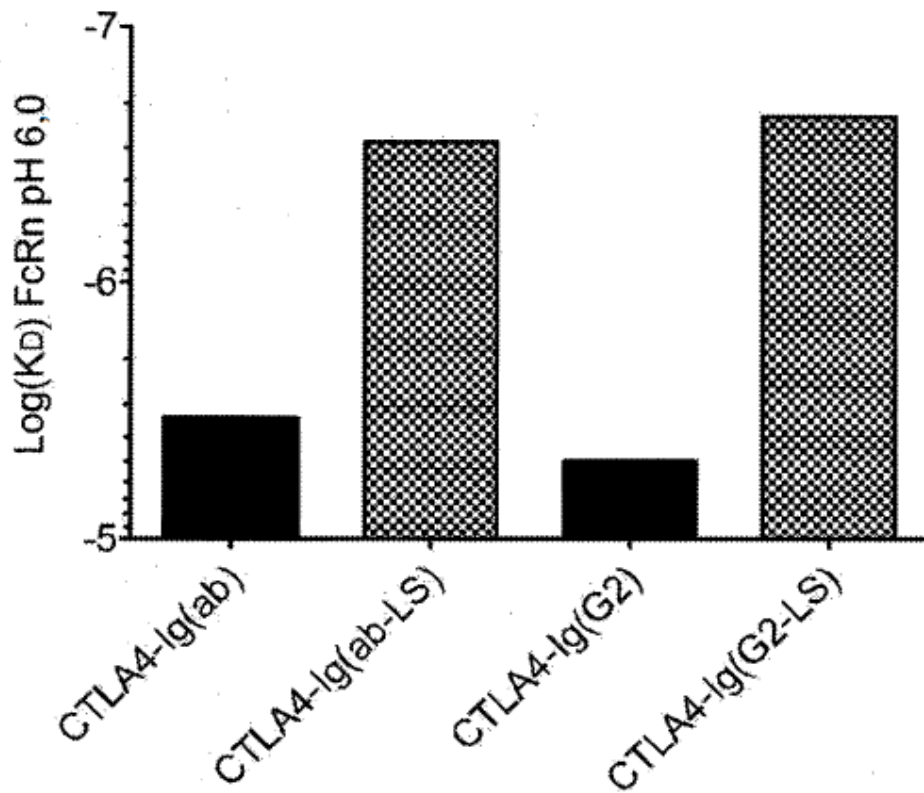


Figura 14

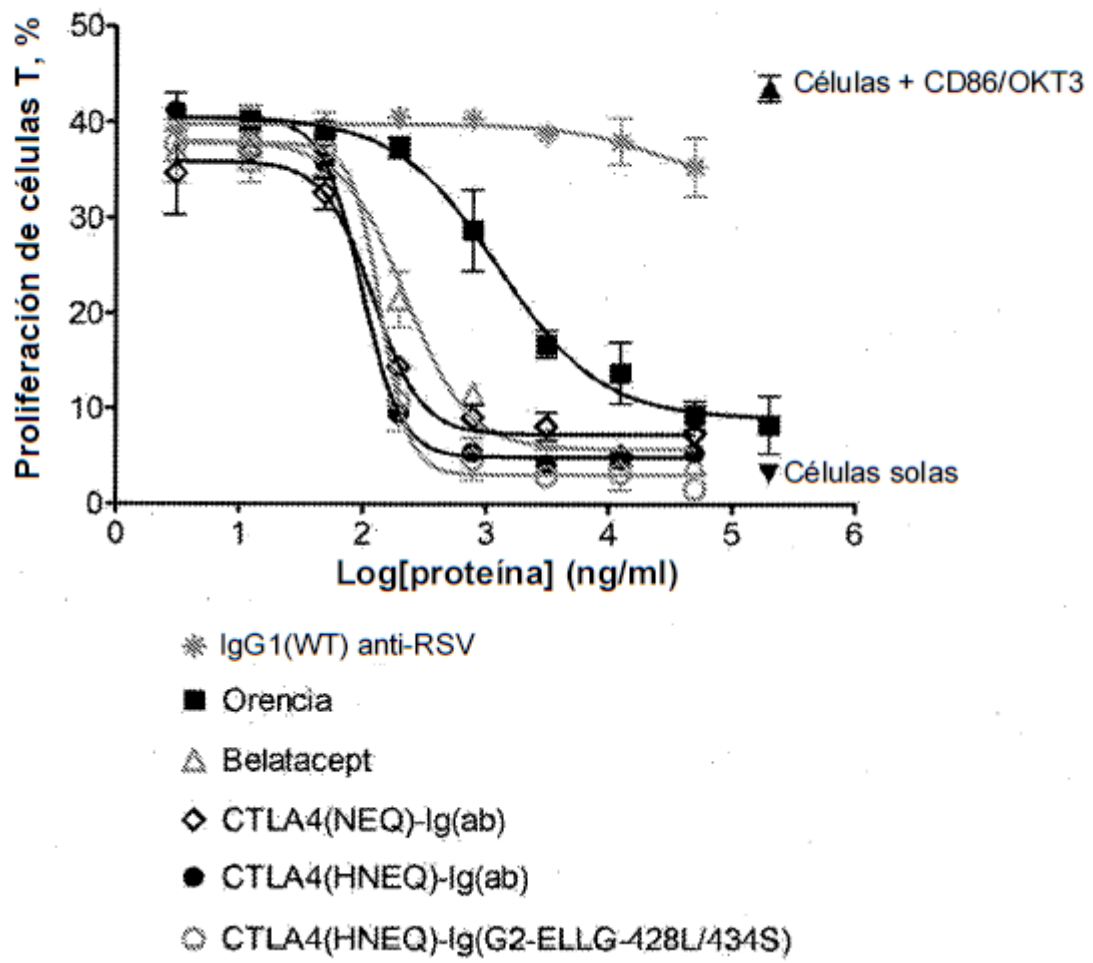


Figura 15

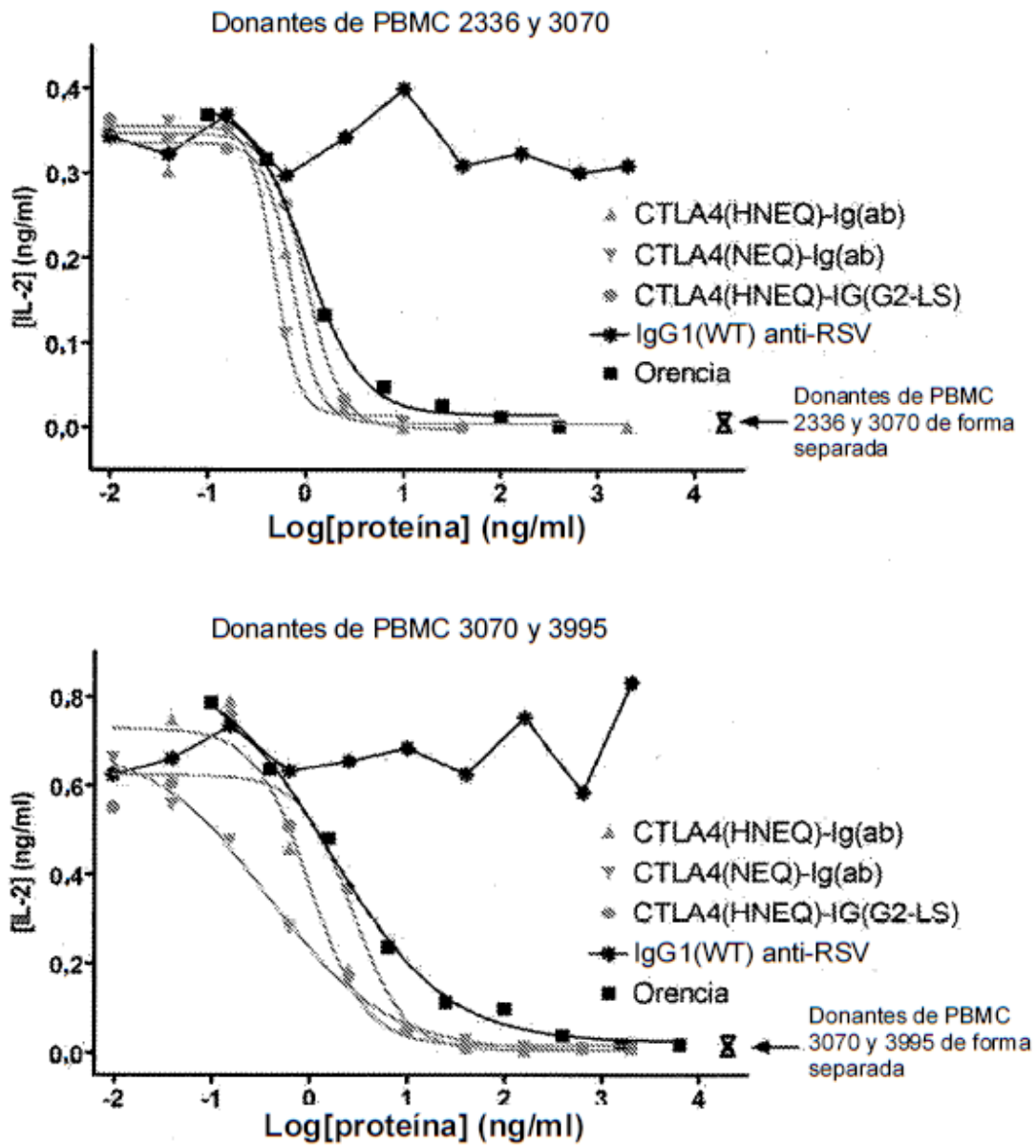


Figura 16

