Industria y Comercio

Organizacion CSA Ltda

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

DVN
OK

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** 07-104769

54. **TÍTULO** "METODOS PARA TRATAMIENTO DE TRASTORNOS INMUNES ASOCIADOS CON TRASPLANTE DE INJERTO CON MOLECULAS MUTANTES CTLA4 SOLUBLES"

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** A61K 38/17

71. **SOLICITANTE** BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

DOMICILIO NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. **APODERADO** ALVARO CORREA ORDÓÑEZ
T.P. 20.281

22. **BOGOTÁ, D. C.,** 5 DE OCTUBRE DE 2007.

(FORMA P-10)

98124 -Imprenta Nacional de Colombia - 2007

PETITORIO

00093

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-104769- -00000-0000
Fecha: 2007-10-05 16:14:12 Dep: 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 379

dicación

FORMULARIO ÚNICO D

PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

6/11

(1) SOLICITUD DE :

[X] Patente de Invención [ ] Patente de Modelo de Utilidad

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

Dirección: Route 206 and Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543-4000, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América

Teléfono: Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

C.C. [ ] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual

Número

(3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6

Teléfono: 634 1500 Fax: 376 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C. [X] NIT [ ]

C.E. [ ] Otro [ ]

Cual

Número 79.143.366 de Usaquén TP 20.281

(4) INVENTOR (ES) (72)

Nombre: HAGERTY, David y RUSNAK, James

Dirección: 3 Nobadeer Drive, Pennington, New Jersey 08534, Estados Unidos de América y 640 Pineville Road, Newtown, Pennsylvania 18940 , Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidenses

(5) PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/012648 Fecha 05-ABR-06

Publicación Internacional No. WO/2006/108035 Fecha 12-OCT-06

(6) Título (54) METODOS PARA TRATAMIENTO DE TRASTORNOS INMUNES ASOCIADOS CON TRASPLANTE DE INJERTO CON MOLECULAS MUTANTES CTLA4 SOLUBLES

(7) Clasificación Internacional (51) A61K 38/17

(8) Prioridad SI [X] NO [ ]	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US	06-ABR-05	60/668,774

(9) Comprobante de pago No. 07-66636 **Fecha 16-AGO-07**

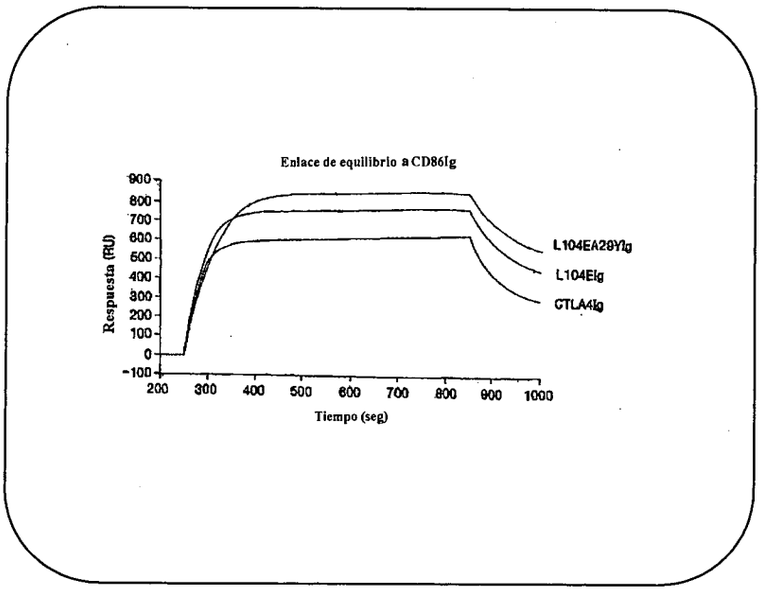
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página

(10) **ANEXOS**

00092

- [X] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [X] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [X] Poderes, si fuere el caso
- [X] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [X] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [X] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- [ ] Arte final 12 x 12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [X] Otros: Extractos, Reporte de búsqueda y opinión escrita y notificación de presentación de documento de prioridad

(11) **FIGURA CARATERISTICA**



(12) Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

00003

00000017

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 66,636
FECHA : AGOSTO 16 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-104769- -00000-0000

Fecha: 2007-10-05 16:14:12 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 379

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
RAISBECK LARA RODRIGUEZ	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	48717720	16/08/2007	73,144,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO		TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN		482,000.00
		TOTAL :	$	482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

POD-4002

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 0507071 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

PODER OTORGADO POR BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

APOSTILLA

1. PAÍS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

2. ESTE DOCUMENTO PÚBLICO HA SIDO FIRMADO POR:
SALLY B. HANSEN

3. QUIEN ACTÚA EN CALIDAD DE NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY

4. LLEVA EL SELLO DE:
SALLY B. HANSEN, NOTARIO

CERTIFICADO

5. EN TRENTON, NUEVA JERSEY

6. EL 28 DE JUNIO DE 2007

7. POR BRADLEY ABELOW, TESORERO DE NUEVA JERSEY

8. N° A295716

9. SELLO (APARECE ADHERIDO SELLO DORADO)

10. FIRMA (FIRMADO) BRADLEY ABELOW

Texto en inglés y en español mediante el cual **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** domiciliada en Nueva York, Nueva York, otorga poder a **ALVARO CORREA ORDOÑEZ y/o OLGA GEORGETTE OTERO y/o RICARDO METKE y/o JUAN PABLO CONCHA**

Dado y suscrito el 30 de mayo de 2007

(Firmado) Anastasia P. Winslow, Senior Patent Counsel (Abogado de Patentes Senior)

JAIME A. GARAVITO

NOTARIO ONCE DE ESTE CIRCULO PUEDE COTEJAR QUE ESTA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

05 OCT 2007

BOGOTÁ, D.C. - COLOMBIA

ZULMA NAVARRO DE BAUTISTA
NOTARIA ONCE (11)

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 0507071 al español de un documento escrito en inglés, efectuada por Jaime Armando Garavito Burgos, c.c. N° 19.130.702 de Bogotá, Traductor e Intérprete Oficial inglés-español-inglés según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

Texto en inglés y en español mediante el cual el suscrito Notario certifica el 30 de mayo de 2007 la existencia legal de la sociedad **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** así como las funciones y firma de su representante autorizado Anastasia P. Winslow, Senior Patent Counsel (Abogado de Patentes Senior) para lo cual se basó en los documentos relacionados en inglés en el punto 6 de la certificación los cuales se traducen aquí al español, a saber:

Certificación suscrita por el Vicepresidente Senior y el Asesor Legal de Bristol-Myers Squibb Company el 7 de abril de 2007.

Certificado de Constitución Enmendado y Replanteado de Bristol-Myers Squibb Company fechado mayo 24, 2005.

[Firmado] SALLY B. HANSEN, Notario Público

[Sello en tinta que dice: "SALLY B. HANSEN. Notario Público de Nueva Jersey. Mi comisión vence el 6 de junio de 2010"]

[Aparece sello realzado]

La anterior es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

Jaime Armando Garavito Burgos
c.c. N° 19.130.702 de Bogotá
Traductor e Intérprete Oficial según Resolución N° 034 de enero 11 de 1983 expedida por el Ministerio de Justicia

BOGDM5 # 82106

JAIME A. GARAVITO B.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
Res. 034 de Enero 11 de 1983
MINISTERIO DE JUSTICIA

COTEJO ONCE DE ESTE CÍRCULO NOTARIAL
FOTOCOPIA QUE CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
30 OCT 2007
BOGOTÁ, D.C. - COLOMBIA
ZULMA NAVARRO DE BAUTISTA
NOTARIA ONCE (11)

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA

2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
SALLY B HANSEN

3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY

4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
SALLY B HANSEN, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY

6. THE 28TH DAY OF JUNE 2007

7. BY: Bradley Abelow, NEW JERSEY TREASURER

8. NO. A295716

9. SEAL/STAMP:

10. SIGNATURE

Bradley Abelow

00007

BAKER & MCKENZIE

Baker, Lara, Rodríguez & Rueda
Av. 82 No. 10 - 62 6th Floor
Bogotá, Colombia

NIT: 860.068.840-3
Tel: +57 1 634 1500
Fax: +57 1 376 2211
www.bakernet.com

POWER OF ATTORNEY

The undersigned,

BRISTOL–MYERS SQUIBB COMPANY

domiciled in

Route 206 and Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543-4000 United States of America

declares that it hereby grants to

ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA

with domicile at Av. 82 No. 10 – 62, 6Th floor, of Bogotá D. C., Colombia, a full and sufficient power of attorney to obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models, industrial designs, integrated circuits, layout-designs and vegetal varieties; the registration of trademarks, denominations of origin, commercial names, trade emblems, slogans and domain names; its renewal, assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b)Processes of protection to the consumer, unfair competition, oppositions, cancellations, nullity, precautionary injunctions, infringement, granting of licenses, writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, an administrative processes relating to those rights. And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

I hereby ratify all actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 30 day of May of 2007

Signature of the person issuing the Power

Anastasia P. Winslow
Senior Patent Counsel

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

BRISTOL–MYERS SQUIBB COMPANY

domiciliada en

Route 206 and Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543-4000 Estados Unidos de América

declara por el presente que otorga a

ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA

con domicilio en la Av. 82 No. 10 – 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, poder especial amplio y suficiente, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera autoridades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, esquemas de trazado de circuitos integrados y variedades vegetales; el registro de marcas, denominaciones de origen, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales y nombres de dominio; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Los procesos para la protección del consumidor, competencia desleal, oposiciones, cancelaciones, nulidades, medidas cautelares, infracciones, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del caso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Igualmente, ratifico todo lo actuado hasta el momento en los mismos asuntos, por cualquiera de los mencionados apoderados en representación de ésta sociedad.

Dado y firmado en

A los 30 días del mes de mayo de 2007

Firma de la persona que firma el Poder

COPIA NOTARIO ONCE DE ESTE PASO CONSTAR QUE ESTA COINCIDE CON EL ORIGINAL PRESENTADO A LA VISTA
03 OCT 2007
BOGOTÁ, D.C. - COLOMBIA
ZULMA NAVARRO DE BAUTISTA
NOTARIA ONCE (11)

NOTARIAL CERTIFICATION

On this 30 day of May

2007 , the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That **Name of the person issuing the power**
Anastasia P. Winslow
of legal age and domiciled in
Princeton, NJ USA
Address, city, state, country

set his hand on the foregoing document.

2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.

3. That the grantor has executed the foregoing document as
Senior Patent Counsel
Position of the person issuing the Power
of the judicial person **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**

4. That the judicial person **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**
having its home office in

Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 United States of America

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.

6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:
(Please indicate here the documents such as the articles of incorporation, by laws or resolution from the Board of Directors and their dates, on which the notary relied to grant the certification)
- Certification executed by Sr. Vice President and General Counsel of Bristol-Myers Squibb Company on April 7, 2007
- Amended and Restated Certificate of Incorporation of Bristol-Myers Squibb Company dated May 24, 2005

Notary Public
SALLY B. HANSEN
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires June 6, 2010

CERTIFICACION NOTARIAL

A los 30 días del mes de mayo

de 2007 , el suscrito Notario

DA FE

1 Que Anastasia P. Winslow

mayor y domiciliado en Princeton, NJ
Estados Unidos de América

suscribió de su puño y letra el documento que antecede.

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

3 Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

Abogados de Patentes Senior
de la persona jurídica **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**

4 Que la persona jurídica **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**

con sede en

Route 206 and Province Line Road, Princeton,
New Jersey 08543-4000 Estados Unidos de América

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5 Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:
- Certificación suscrita por el Vicepresidente Senior y el Asesor Legal de Bristol-Myers Squibb Company el 7 de abril de 2007.
- Certificado de Constitución Enmendado y Replanteado de Bristol-Myers Squibb Company fechado el 4 de mayo de 2005.

El Notario Público

30 OCT 2007
BOGOTÁ, D.C. - COLOMBIA
ZULMA NAVARRO DE BAUTISTA
NOTARIA ONCE (11)

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-2-1	Declaration: Entitlement to apply for and be granted a patent Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51bis.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate. Name (LAST, First)	in relation to this international application BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:
VIII-2-1(iv)		an assignment from HAGERTY, David to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 15 June 2005 (15.06.2005)
VIII-2-1(iv)		an assignment from RUSNAK, James to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 03 May 2005 (03.05.2005)
VIII-2-1(ix)	This declaration is made for the purposes of	all designations except the designation of the United States of America

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VIII-3-1	**Declaration: Entitlement to claim priority** Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application specified below, where the applicant is not the applicant who filed the earlier application or where the applicant's name has changed since the filing of the earlier application (Rules 4.17(iii) and 51bis.1(a)(iii)) Name	in relation to this international application BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY is entitled to claim priority of earlier application No. 60/668,774 by virtue of the following:
VIII-3-1(iv)		an assignment from HAGERTY, David to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 15 June 2005 (15.06.2005)
VIII-3-1(iv)		an assignment from RUSNAK, James to BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, dated 03 May 2005 (03.05.2005)
VIII-3-1(ix)	This declaration is made for the purposes of:	AP: (BW GH GM KE LS MW MZ NA SD SL SZ TZ UG ZM ZW); EA: (AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM); EP: (AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LT LU LV MC NL PL PT RO SE SI SK TR); OA: (BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG); AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BW BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE EG ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KM KN KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV LY MA MD MG MK MN MW MX MZ NA NG NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SM SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG UZ VC VN YU ZA ZM ZW

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
12 October 2006 (12.10.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/108035 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 38/17 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/012648

(22) International Filing Date: 5 April 2006 (05.04.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/668,774 6 April 2005 (06.04.2005) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** [US/US]; Route 206 And Province Line Road, Princeton, New Jersey 08543-4000 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **HAGERTY, David** [US/US]; 3 Nobadeer Drive, Pennington, New Jersey 08534 (US). **RUSNAK, James** [US/US]; 640 Pineville Road, Newtown, Pennsylvania 18940 (US).

(74) Agents: **PARLET, Nickki** et al.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Princeton, New Jersey 08543-4000 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

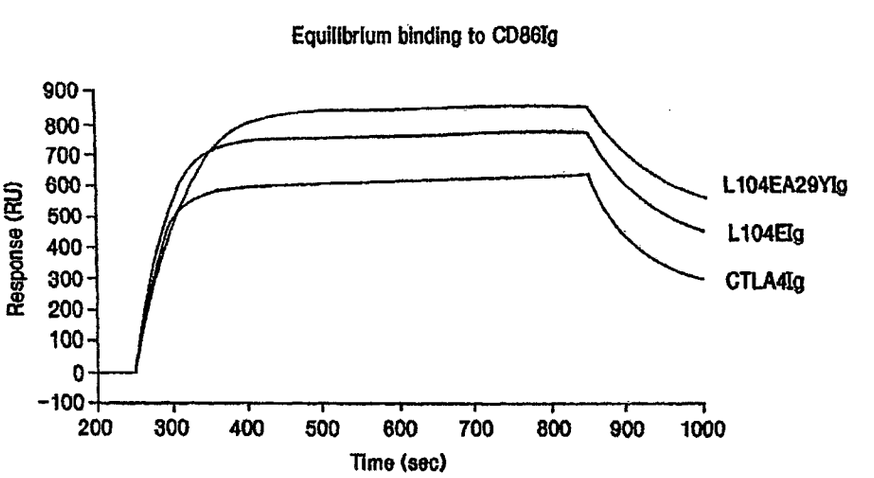
Published:

— *with international search report*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS FOR TREATING IMMUNE DISORDERS ASSOCIATED WITH GRAFT TRANSPLANTATION WITH SOLUBLE CTLA4 MUTANT MOLECULES



(57) Abstract: The present invention provides use of soluble CTLA4 mutant molecules which bind with greater avidity to the CD80 and/or CD86 antigen than wild type CTLA4 or non-mutated CTLA4Ig in the treatment of immune disorders associated with graft transplantation.

WO 2006/108035 A1

METHODS FOR TREATING IMMUNE DISORDERS ASSOCIATED WITH GRAFT TRANSPLANTATION WITH SOLUBLE CTLA4 MUTANT MOLECULES

RELATED APPLICATION

[0001] This application claims priority benefit under Title 35 § 119(e) of United States provisional Application No. 60/668,774, filed April 6, 2005, the contents of which are herein incorporated by reference.

[0002] Throughout this application various publications are referenced. The disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by reference into this application in order to more fully describe the state of the art to which this invention pertains.

FIELD OF THE INVENTION

[0003] The present invention relates to the use of soluble CTLA4 mutant molecules, with increased binding avidity to CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) compared with wild type CTLA4, in the treatment of immune disorders associated with graft transplantation.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0004] Given the central role of T-cells in transplant rejection, a common goal among current immunosuppressive therapies is to block T-cell activation and function (Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. N Engl J Med 1998;338(25):1813-21). T-cells require both an antigen-specific (Signal 1) and co-stimulatory signal (Signal 2) for full activation (Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. Annu Rev Immunol 1996;14:233-58). One of the best-characterized co-stimulatory pathways involves the CD28-CD80/86 (B7–1/2) interaction (Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. Annu Rev Immunol 1993;11:191-212). Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) binds to CD80/86 with higher avidity than CD28, and is transiently expressed on T-cells

following their activation, where it interrupts the interaction between CD28 and CD80/86 (Oosterwegel MA, Greenwald RJ, Mandelbrot DA, Lorsbach RB, Sharpe AH. CTLA-4 and T cell activation. Curr Opin Immunol 1999;11(3):294-300.). This creates a negative feedback signal for T-cell activation.

[0005] Intervention in this pathway has been previously pursued with CTLA4Ig. CTLA4Ig has been successfully used as a strategy to treat T-cell-mediated autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis (Kremer JM, Westhovens R, Leon M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. N Engl J Med 2003;349(20):1907-15) and psoriasis (Abrams JR, Lebwohl MG, Guzzo CA, et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. J Clin Invest 1999;103(9):1243-52).

[0006] LEA29Y has been studied in non-human primate transplant models alone and in combination with other immunosuppressive agents. Christian Larsen et al (C. Larsen, T. Pearson, A. Adams, P. Tso, N. Shirasugi, E. Strobert, D. Anderson, S. Cowan, K. Price, J. Naemura, J. Emswiler, J. Greene, L.A. Turk, J. Bajorath, R. Townsend, D. Hagerty, P. Linsley and R. Peach; Rational Development of LEA29Y (belatacept), a High-Affinity Variant of CTLA4-Ig with Potent Immunosuppressive Properties; American Journal of Transplantation; Vol. 5, Issue 3, March 2005, p.443) have shown the enhanced immunosuppressive activity of LEA29Y when compared to CTLA4-Ig in a non-human primate model utilized to study renal allograft rejection. LEA29Y was administered intra-operatively (10 mg/kg intravenously), on day 4 (15 mg/kg) and on post-operative days 14, 28, 42, 56 and 70 (20 mg/kg intravenously). CTLA4Ig (16mg/kg) was administered intra-operatively and on post-operative days 4, 8, 11 and 16. The treatment regimen also included MMF (15 mg/kg bid s.c. on days 0-14, qd on days 15-180), methylprednisolone (subcutaneouse injection according to the following schedule, day 0: 20 mg, day 1: 16 mg, day 3: 8 mg, day 4 :4mg, day 5-14: 3mg, day 15-180: 1mg) and basiliximab (0.3 gm/kg i.v. on day 0 and 4). Survival of renal allograft recipients treated with LEA29Y was clearly superior to that of a group treated with CTLA4-Ig despite comparable serum concentrations. Control recipients treated with albumin showed a similar median survival time to the group treated with CTLA4-Ig. However, despite ongoing treatment with LEA29Y, all

recipients experienced a significant decline in renal function (rise in serum creatinine).

[0007] Andrew Adams et al (A. Adams, N. Shirasugi, T. Jones, M. Durham, E. Strobert, S. Cowan, P. Rees, R. Hendrix, K. Price, N. Kenyon, D, Hagerty, R. Townsend, D. Hollenbaugh, T. Pearson and C. Larsen; Development of a Chimeric Anti-CD40 Monoclonal Antibody That Synergizes with LEA29Y to Prolong Islet Allograft Survival; The Journal of Immunology; Jan 2005; 174; p. 542) have shown that the combination of LEA29Y and Chi220 (a chimeric anti-human CD40 mab) act synergistically in a non-human primate model of pancreatic islet transplantation to prolong allograft survival. LEA29Y was administered intravenously intra-operatively (20mg/kg);on postoperative days 4, 7 and 14; then every 2 weeks until day 100. Additonal doses (20mg/kg) were administered monthly through 6 months. Four protocols were tested: 1) LEA29Y alone, 2) Chi220 (anti-CD40), 3)LEA29Y combined with Chi220, and 4) LEA29Y combined with anti-CD20.

[0008] Andrew Adams et al (A. Adams, N. Shirasugi, M. Durham, E. Strobert, D. Anderson, P. Rees, S. Cowan, H. Xu, Y. Blinder, M. Cheung, D. Hollenbaugh, N. Kenyon, T. Pearson and C. Larsen; Calcineurin Inhibitor-Free CD28 Blockade-Based Protocol Protects Allogeneic Islets in Nonhuman Primates; Diabetes, Vol. 51(2), February 2002, p. 265) have shown that the combination of LEA29Y , rapamycin, and anti-IL-2R mAb significantly prolonged islet allograft survival. in a non-human primate model of pancreatic islet transplantation. LEA29Y was administered intravenously intra-operatively (10 mg/kg) and on postoperative day 4 (15mg/kg). Additional does of 20 mg/kg were given on postoperative day 14 and every 2 weeks until postoperative day 154.

[0009] During 2003 more than 25,000 organs were transplanted in the US. Kidney transplantation represented approximately 60% of the solid organ transplants followed by liver transplants at 21%, heart at 8%, lung at 4% and the remaining 7% represented other organ transplants such as pancreas and intestine. (OPTN/SRTR Annual Report 2004 at www.optn.org)

[0010] Renal transplantation is the most effective treatment for end-stage renal disease. It provides improved survival and quality of life (QoL). Maintenance of a functioning renal transplant mandates lifelong immunosuppressive therapy to prevent

immune destruction of the graft. Current immunosuppressive regimens yield 1-year survival rates of 89% for cadaveric and 94% for living-donor grafts. Over time, however, there is progressive loss of both subjects and grafts. Five-year survival for cadaveric and living-related donor renal transplants is 66% and 79%, respectively.(United Network for Organ Sharing Renal Transplant Registry 2003 at www.unos.org)

[0011] The most common causes of long-term subject and graft loss are cardiovascular disease and chronic allograft nephropathy (CAN), respectively.(L.C. Paul, Chronic allograft nephropathy – A model of impaired repair rom injury? Nephrol Dial Transplant 2000;15:149-151) Paradoxically, the principal therapies for renal transplantation, the calcineurin inhibitors (CNIs), CsA and tacrolimus, directly contribute to long-term allograft loss and subject death, since they are inherently nephrotoxic, and also cause or exacerbate cardiovascular risks, including hypertension, hypercholesterolemia, and diabetes mellitus. Nonetheless, these agents form the cornerstone of all conventional immunosuppressive regimens for renal transplantation.

[0012] At present, there are no approved agents that can replace CNIs as cornerstone maintenance immunosuppressant therapy in a broad range of subjects. One agent, sirolimus(rapamycin, Rapamune® from Wyeth/Ayerst), has been approved for use in a CNI-sparing regimen. CNIs, however, must still be used with sirolimus for at least 3 months post-transplantation. More importantly, sirolimus has been approved as a CNI-sparing agent in this setting only for subjects at low to moderate risk of graft loss. Thus, for those at higher risk of graft loss, in whom avoidance of the nephrotoxic effects of CNIs would be of greatest benefit, there is no approved alternative to CNIs.

[0013] Therefore, there is an unmet medical need for immunosuppressive agents that can provide acceptable control of the alloimmune response comparable to standard of practice therapies without toxicities that contribute to long-term subject death and graft loss. Ideally, the agent would be useful not only in low-risk subjects, but also in subjects at higher risk of graft loss.

SUMMARY OF INVENTION

[0014] The present invention provides methods for treating immune disorders associated with graft transplantation by administering CTLA4 mutant molecules which bind with greater avidity to the CD80 and/or CD86 antigen than wild type CTLA4 or non-mutated CTLA4Ig. The CTLA4 molecules have a first amino acid sequence comprising the extracellular domain of CTLA4, where certain amino acid residues within the S25-R33 region and M97-G107 region are mutated. The mutant molecules of the invention may also include a second amino acid sequence which increases the solubility of the mutant molecule.

[0015] One example of a CTLA4 mutant molecule is L104EA29YIg (Figure 7, SEQ ID NOS: 3 and 4), as described herein. Another example of a CTLA4 mutant molecule is L104EIg (Figure 8, SEQ ID NOS: 5 and 6), as described herein. L104EA29YIg and L104EIg bind CD80 and CD86 more avidly than CTLA4Ig.

[0016] Administration of the CTLA4 mutant molecules of the invention may be performed over various times. Typically, administration regimens included an early phase, in which doses are higher and the frequency of administration is increased during the period of greatest immunologic risk, followed by a maintenance phase. The early phase may range from the first 3 to 6 months post- transplantation. The administration regimen during early phase may vary depending on the status of the recipient/graft.

[0017] In one embodiment the present invention provides a method for treating an immune disorder associated with graft transplantation by administering to a subject an effective dose of a CTLA4 mutant molecule with an extracellular domain of CTLA4 as shown in SEQ ID NO:8 beginning with alanine at position 26 or methionine at position 27 and ending with aspartic acid at position 150, or a portion thereof. Additionally, in the extracellular domain or portion thereof an alanine at position 55 is substituted with a tyrosine, and a leucine at position 130 is substituted with a glutamic acid. Further the administration regimen comprises an early phase regimen, wherein the early phase regimen may range from the first 3 to 6 months post-transplantation and involves administration that initially is more frequent than monthly.

[0018] In another embodiment the present invention provides a method for treating an immune disorder associated with graft transplantation by administering to

a subject an effective dose of a CTLA4 mutant molecule with an amino acid sequence beginning with methionine at position 27 and ending with aspartic acid at position 150 of SEQ ID NO:4, or with an amino acid sequence beginning with alanine at position 26 and ending with aspartic acid at position 150 of SEQ ID NO:4. Further the CTLA4 mutant molecule administration regimen comprises an early phase regimen, wherein the early phase regimen may range from the first 3 to 6 months post-transplantation and involves administration that initially is more frequent than monthly.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

[0019] Figure 1 shows the equilibrium binding analysis of L104EA29YIg, L104EIg, and wild-type CTLA4Ig to CD86Ig.

[0020] Figures 2A & 2B illustrate data from FACS assays showing binding of L104EA29YIg, L104EIg, and CTLA4Ig to human CD80- or CD86-transfected CHO cells as described in Example 2, infra.

[0021] Figures 3A & 3B depicts inhibition of proliferation of CD80-positive and CD86-positive CHO cells as described in Example 2, infra.

[0022] Figures 4A & 4B shows that L104EA29YIg is more effective than CTLA4Ig at inhibiting proliferation of primary and secondary allostimulated T cells as described in Example 2, infra.

[0023] Figures 5A-C illustrate that L104EA29YIg is more effective than CTLA4Ig at inhibiting IL-2 (FIG. 5A), IL-4 (FIG. 5B), and γ-interferon (FIG. 5C) cytokine production of allostimulated human T cells as described in Example 2, infra.

[0024] Figure 6 demonstrates that L104EA29YIg is more effective than CTLA4Ig at inhibiting proliferation of phytohemaglutinin- (PHA) stimulated monkey T cells as described in Example 2, infra.

[0025] Figure 7 (SEQ ID NOS: 3 and 4) depicts a nucleotide and amino acid sequence of a CTLA4 mutant molecule ("L104EA29YIg") comprising a signal peptide; a mutated extracellular domain of CTLA4 starting at methionine at position +1 and ending at aspartic acid at position +124, or starting at alanine at position –1 and ending at aspartic acid at position +124; and an Ig region as described in Example 1, infra. SEQ ID NOS: 3 and 4 depict a nucleotide and amino acid sequence,

respectively, of a CTLA4 mutant molecule ("L104EA29YIg") comprising a signal peptide; a mutated extracellular domain of CTLA4 starting at methionine at position +27 and ending at aspartic acid at position +150, or starting at alanine at position +26 and ending at aspartic acid at position +150; and an Ig region.

[0026] Figure 8 (SEQ ID NOS: 5 and 6) depicts a nucleotide and amino acid sequence of a CTLA4 mutant molecule ("L104EIg") comprising a signal peptide; a mutated extracellular domain of CTLA4 starting at methionine at position +1 and ending at aspartic acid at position +124, or starting at alanine at position –1 and ending at aspartic acid at position +124; and an Ig region as described in Example 1, infra. SEQ ID NOS: 5 and 6 depict a nucleotide and amino acid sequence, respectively, of a CTLA4 mutant molecule ("L104EIg") comprising a signal peptide; a mutated extracellular domain of CTLA4 starting at methionine at position +27 and ending at aspartic acid at position +150, or starting at alanine at position +26 and ending at aspartic acid at position +150; and an Ig region.

[0027] Figure 9 (SEQ ID NOS: 7 and 8) depicts a nucleotide and amino acid sequence of a CTLA4Ig having a signal peptide; a wild type amino acid sequence of the extracellular domain of CTLA4 starting at methionine at position +1 to aspartic acid at position +124, or starting at alanine at position -1 to aspartic acid at position +124; and an Ig region. SEQ ID NOS: 7 and 8 depict a nucleotide and amino acid sequence, respectively, of a CTLA4Ig comprising a signal peptide; a wild type amino acid sequence of the extracellular domain CTLA4 starting at methionine at position +27 and ending at aspartic acid at position +150, or starting at alanine at position +26 and ending at aspartic acid at position +150; and an Ig region.

[0028] Figures 10A-C are an SDS gel (FIG. 10A) for CTLA4Ig (lane 1), L104EIg (lane 2), and L104EA29YIg (lane 3A); and size exclusion chromatographs of CTLA4Ig (FIG. 10B) and L104EA29YIg (FIG. 10C).

[0029] Figures 11A and 11B illustrate a ribbon diagram of the CTLA4 extracellular Ig V-like fold generated from the solution structure determined by NMR spectroscopy. FIG. 11B shows an expanded view of the S25-R33 region and the MYPPPY region indicating the location and side-chain orientation of the avidity enhancing mutations, L104 and A29.

[0030] Figure 12 depicts a schematic diagram of a vector, piLN-L104EA29Y, having the L104EA29YIg insert.

[0031] Figure 13 depicts nucleotide and amino acid sequence of CTLA4 receptor (SEQ ID NOS: 9 and 10).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

DEFINITIONS

[0032] All scientific and technical terms used in this application have meanings commonly used in the art unless otherwise specified. As used in this application, the following words or phrases have the meanings specified.

[0033] As used herein, "ligand" refers to a molecule that specifically recognizes and binds another molecule, for example, a ligand for CTLA4 is a B7 molecule.

[0034] As used herein "wild type CTLA4" or "non-mutated CTLA4" has the amino acid sequence of naturally occurring, full length CTLA4 as shown in Figure 13 (SEQ ID NOS: 9 and 10; also as described U.S. Patent Nos. 5,434,131, 5,844,095, 5,851,795), or any portion or derivative thereof, that recognizes and binds a B7 or interferes with a B7 so that it blocks binding to CD28 and/or CTLA4 (e.g., endogenous CD28 and/or CTLA4). In particular embodiments, the extracellular domain of wild type CTLA4 begins with methionine at position +1 and ends at aspartic acid at position +124, or the extracellular domain of wild type CTLA4 begins with alanine at position -1 and ends at aspartic acid at position +124. Wild type CTLA4 is a cell surface protein, having an N-terminal extracellular domain, a transmembrane domain, and a C-terminal cytoplasmic domain. The extracellular domain binds to target molecules, such as a B7 molecule. In a cell, the naturally occurring, wild type CTLA4 protein is translated as an immature polypeptide, which includes a signal peptide at the N-terminal end. The immature polypeptide undergoes post-translational processing, which includes cleavage and removal of the signal peptide to generate a CTLA4 cleavage product having a newly generated N-terminal end that differs from the N-terminal end in the immature form. One skilled in the art will appreciate that additional post-translational processing may occur, which removes one or more of the amino acids from the newly generated N-terminal end of the CTLA4 cleavage product. Alternatively, the signal peptide may not be removed

completely, generating molecules that begin before the common starting amino acid methionine. Thus, the mature CTLA4 protein may start at methionine at position +1 or alanine at position –1. The mature form of the CTLA4 molecule includes the extracellular domain or any portion thereof, which binds to B7.

[0035] "CTLA4Ig" is a soluble fusion protein comprising an extracellular domain of wildtype CTLA4 joined to an Ig tail, or a portion thereof that binds a B7. A particular embodiment comprises the extracellular domain of wild type CTLA4 (as shown in Figure 9, SEQ ID NOS: 7 and 8) starting at methionine at position +1 and ending at aspartic acid at position +124; or starting at alanine at position -1 to aspartic acid at position +124; a junction amino acid residue glutamine at position +125; and an immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357 or glycine at position +356 (DNA encoding CTLA4Ig was deposited on May 31, 1991 with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 under the provisions of the Budapest Treaty, and has been accorded ATCC accession number ATCC 68629; Linsley, P., et al., 1994 *Immunity* 1:793-80. CTLA4Ig-24, a Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line expressing CTLA4Ig was deposited on May 31, 1991 with ATCC identification number CRL-10762). The soluble CTLA4Ig molecules may or may not include a signal (leader) peptide sequence.

[0036] As used herein, a "fusion protein" is defined as one or more amino acid sequences joined together using methods well known in the art and as described in U.S. Pat. No. 5,434,131 or 5,637,481. The joined amino acid sequences thereby form one fusion protein.

[0037] As used herein, "soluble" refers to any molecule, or fragments and derivatives thereof, not bound or attached to a cell, i.e., circulating. For example, CTLA4, B7 or CD28 can be made soluble by attaching an immunoglobulin (Ig) moiety to the extracellular domain of CTLA4, B7 or CD28, respectively. Alternatively, a molecule such as CTLA4 can be rendered soluble by removing its transmembrane domain.

[0038] As used herein "the extracellular domain of CTLA4" is the portion of CTLA4 that recognizes and binds CTLA4 ligands, such as B7 molecules. For example, an extracellular domain of CTLA4 comprises methionine at position +1 to

aspartic acid at position +124 (Figure 13, SEQ ID NOS: 9 and 10). Alternatively, an extracellular domain of CTLA4 comprises alanine at position –1 to aspartic acid at position +124 (Figure 13, SEQ ID NOS: 9 and 10). The extracellular domain includes fragments or derivatives of CTLA4 that bind a B7 molecule. The extracellular domain of CTLA4 as shown in Figure 13 (SEQ ID NOS: 9 and 10) may also include mutations that change the binding avidity of the CTLA4 molecule for a B7 molecule.

[0039] As used herein, a "CTLA4 mutant molecule" means wildtype CTLA4 as shown in (SEQ ID NOS: 9 and 10) or any portion or derivative thereof, that has a mutation or multiple mutations (preferably in the extracellular domain of wildtype CTLA4). A CTLA4 mutant molecule has a sequence that it is similar but not identical to the sequence of wild type CTLA4 molecule, but still binds a B7. The mutations may include one or more amino acid residues substituted with an amino acid having conservative (e.g., substitute a leucine with an isoleucine) or non-conservative (e.g., substitute a glycine with a tryptophan) structure or chemical properties, amino acid deletions, additions, frameshifts, or truncations. CTLA4 mutant molecules may include a non-CTLA4 molecule therein or attached thereto. The mutant molecules may be soluble (i.e., circulating) or bound to a cell surface. Additional CTLA4 mutant molecules include those described in U.S. Patent Application Serial Numbers 09/865,321, 60/214,065 and 60/287,576; in U.S. Patent Numbers 6,090,914 5,844,095 and 5,773,253; and as described by Peach, R. J., *et al.*, in *J Exp Med* 180:2049-2058 (1994)). CTLA4 mutant molecules can be made synthetically or recombinantly.

[0040] "L104EA29YIg" is a fusion protein that is a soluble CTLA4 mutant molecule comprising an extracellular domain of wildtype CTLA4 with amino acid changes A29Y (a tyrosine amino acid residue substituting for an alanine at position 29) and L104E (a glutamic acid amino acid residue substituting for a leucine at position +104), or a portion thereof that binds a B7 molecule, joined to an Ig tail (included in Figure 7, SEQ ID NOS: 3 and 4; DNA encoding L104EA29YIg was deposited on June 20, 2000 with ATCC number PTA-2104; copending in U.S. Patent Application Serial Numbers 09/579,927, 60/287,576 and 60/214,065, incorporated by reference herein). The soluble L104EA29YIg molecules used in the methods and/or kits of the invention may or may not include a signal (leader) peptide sequence.

Typically, in the methods and/or kits of the invention, the molecules do not include a signal peptide sequence.

[0041] As used herein, the term "mutation" means a change in the nucleotide or amino acid sequence of a wildtype molecule, for example, a change in the DNA and/or amino acid sequences of the wild-type CTLA4 extracellular domain. A mutation in DNA may change a codon leading to a change in the amino acid sequence. A DNA change may include substitutions, deletions, insertions, alternative splicing, or truncations. An amino acid change may include substitutions, deletions, insertions, additions, truncations, or processing or cleavage errors of the protein. Alternatively, mutations in a nucleotide sequence may result in a silent mutation in the amino acid sequence as is well understood in the art. In that regard, certain nucleotide codons encode the same amino acid. Examples include nucleotide codons CGU, CGG, CGC, and CGA encoding the amino acid, arginine (R); or codons GAU, and GAC encoding the amino acid, aspartic acid (D). Thus, a protein can be encoded by one or more nucleic acid molecules that differ in their specific nucleotide sequence, but still encode protein molecules having identical sequences. The amino acid coding sequence is as follows:

Amino Acid	Symbol	One Letter Symbol	Codons
Alanine	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Cysteine	Cys	C	UGU, UGC
Aspartic Acid	Asp	D	GAU, GAC
Glutamic Acid	Glu	E	GAA, GAG
Phenylalanine	Phe	F	UUU, UUC
Glycine	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Histidine	His	H	CAU, CAC
Isoleucine	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Lysine	Lys	K	AAA, AAG
Leucine	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Methionine	Met	M	AUG
Asparagine	Asn	N	AAU, AAC
Proline	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Glutamine	Gln	Q	CAA, CAG
Arginine	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Serine	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Threonine	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Valine	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Tryptophan	Trp	W	UGG
Tyrosine	Tyr	Y	UAU, UAC

The mutant molecule may have one or more mutations.

[0042] As used herein, a "non-CTLA4 protein sequence" or "non-CTLA4 molecule" means any protein molecule that does not bind B7 and does not interfere with the binding of CTLA4 to its target. An example includes, but is not limited to, an immunoglobulin (Ig) constant region or portion thereof. Preferably, the Ig constant region is a human or monkey Ig constant region, e.g., human C(gamma)1, including the hinge, CH2 and CH3 regions. The Ig constant region can be mutated to reduce its effector functions (U.S. Patents 5,637,481, 5,844,095 and 5,434,131).

[0043] As used herein, a "fragment" or "portion" is any part or segment of a CTLA4 molecule, preferably the extracellular domain of CTLA4 or a part or segment thereof, that recognizes and binds its target, e.g., a B7 molecule. The extracellular domain of CTLA4 may include mutations that change the binding avidity of the CTLA4 molecule for a B7 molecule.

[0044] As used herein, "B7" refers to the B7 family of molecules including, but not limited to, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) and B7-3 that may recognize and bind CTLA4 and/or CD28.

[0045] As used herein, "B7-positive cells" are any cells with one or more types of B7 molecules expressed on the cell surface.

[0046] As used herein, a "derivative" is a molecule that shares sequence homology and activity of its parent molecule. For example, a derivative of CTLA4 includes a soluble CTLA4 molecule having an amino acid sequence at least 70% similar to the extracellular domain of wildtype CTLA4, and which recognizes and binds B7 e.g., CTLA4Ig or soluble CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg.

[0047] As used herein, to "regulate" an immune response is to activate, stimulate, up-regulate, inhibit, block, down-regulate or modify the immune response. The autoimmune diseases described herein, may be treated by regulating an immune response e.g., by regulating functional CTLA4- and/or CD28- positive cell interactions with B7-positive cells. For example, a method for regulating an immune response comprises contacting the B7-positive cells with a soluble CTLA4 molecule of the invention so as to form soluble CTLA4/B7 complexes, the soluble CTLA4 molecule interfering with reaction of an endogenous CTLA4 and/or CD28 molecule with said B7 molecule.

[0048] As used herein, to "block" or "inhibit" a receptor, signal or molecule means to interfere with the activation of the receptor, signal or molecule, as detected by an art-recognized test. Blockage or inhibition may be partial or total. For example, blockage of a cell-mediated immune response can be detected by determining the functionality of the transplant, such as the serum creatinine concentrations following renal transplantation.

[0049] As used herein, "blocking B7 interaction" means to interfere with the binding of B7 to its ligands, such as CD28 and/or CTLA4, thereby obstructing T-cell and B7-positive cell interactions. Examples of agents that block B7 interactions include, but are not limited to, molecules such as an antibody (or portion or derivative thereof) that recognizes and binds to the any of CTLA4, CD28 or B7 molecules (e.g., B7-1, B7-2); a soluble form (or portion or derivative thereof) of the molecules such as soluble CTLA4; a peptide fragment or other small molecule designed to interfere with the cell signal through the CTLA4/CD28/B7-mediated interaction. In a preferred embodiment, the blocking agent is a soluble CTLA4 mutant molecule, such as L104EA29YIg (ATCC PTA-2104).

[0050] As used herein, "treat" or "treating" a disorder or disease means to manage a disease or disorder by medicinal or other therapies. Treatment of a disease or disorder may suppress immune-mediated events associated with a disease, ameliorate the symptoms of a disease or disorder, reduce the severity of a disease or disorder, alter the course of disease or disorder progression and/or ameliorate or cure the basic disease or disorder problem. For example, to treat an immune disorder associated with graft transplantation may be accomplished by regulating an immune response e.g., by regulating functional CTLA4- and/or CD28- positive cell interactions with B7-positive cells. Alternatively, treating an immune disease or disorder may be accomplished by preventing or inhibiting the disease or disorder from occurring or progressing through the use of the compositions described herein. For example, treating renal transplant rejection includes inhibition of renal transplant rejection as measured by glomerular filtration rate (GFR). For example treating immune disorders associated with graft transplantation includes prophylaxis of organ rejection by administration of L104EA29YIg. Further, treating immune disorders associated with graft transplantation may prolong the survival of the host and transplanted organ.

[0051] As used herein, "immune system disease" includes any disease mediated by T-cell interactions with B7-positive cells including, but not limited to, autoimmune diseases, immunoproliferative diseases, and immune disorders associated with graft transplantation.

[0052] As used herein, "immune disorders associated with graft transplantation" means any transplant related disease mediated by T-cell interactions with B7-positive cells including, but not limited to, immune disorders associated with graft transplantation rejection, graft related disorders, graft versus host disease (GVHD) (e.g., such as may result from bone marrow transplantation, or in the induction of tolerance), rejection of the graft or transplant including acute rejection of the graft or transplant and chronic rejection of the graft or transplant. The graft may be solid organ allografts or xenografts, tissue or cell allografts or xenografts or external anatomy allografts or xenografts, including but not limited to skin, islet cells (also known as islets), muscles, hepatocytes, neurons, heart, liver, kidney, lung, appendages, limbs, nose, ear or face.

[0053] As used herein, immunoproliferative diseases include, but are not limited to, T cell lymphoma; T cell acute lymphoblastic leukemia; testicular angiocentric T cell lymphoma; and benign lymphocytic angiitis.

[0054] As used herein autoimmune diseases include, but are not limited to diseases such as lupus (e.g., lupus erythematosus, lupus nephritis), psoriasis; Hashimoto's thyroiditis, primary myxedema, Graves' disease, pernicious anemia, autoimmune atrophic gastritis, Addison's disease, diabetes (e.g., insulin dependent diabetes mellitus, type I diabetes mellitus, type II diabetes mellitus), good pasture's syndrome, myasthenia gravis, pemphigus, Crohn's disease, inflamatory bowl disease (IBD), sympathetic ophthalmia, autoimmune uveitis, multiple sclerosis, autoimmune hemolytic anemia, idiopathic thrombocytopenia, primary biliary cirrhosis, chronic action hepatitis, ulcerative colitis, Sjogren's syndrome, rheumatic diseases (e.g., rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis), polymyositis, scleroderma, and mixed connective tissue disease.

[0055] In order that the invention herein described may be more fully understood, the following description is set forth.

COMPOSITIONS AND METHODS OF THE INVENTION

[0056] The present invention provides a new class of immunosuppressive therapy for transplantation. It is a fusion protein that binds to the B7 molecules on the surface of antigen-presenting cells (APCs) inhibiting requisite co-stimulation for T-cell activation. The soluble CTLA4 mutant molecules of the invention differ from existing immunosuppressants in the restricted distribution of its molecular target and the specificity of its effect. The present invention provides soluble CTLA4 mutant molecules that recognize and bind CD80 and/or CD86. In some embodiments, the soluble CTLA4 mutants have a higher avidity to CD80 and/or CD86 than CTLA4Ig. For example, L104EA29YIg binds approximately 2-fold more avidly than wild type CTLA4Ig (hereinafter referred to as CTLA4Ig) to CD80 and approximately 4-fold more avidly to CD86. This stronger binding results in L104EA29YIg being more affective than CTLA4Ig at blocking immune responses.

[0057] One embodiment of the present invention provides methods for treating immune system diseases. The methods comprise administering a therapeutic composition, comprising soluble CTLA4 mutant molecules disclosed herein, to a subject in an amount effective to relieve at least one of the symptoms associated with immune system diseases. Additionally, the soluble CTLA4 mutant molecules disclosed herein may provide long-term therapy for immune system diseases by blocking the T-cell/B7-positive cell interactions, thereby blocking T-cell activation/stimulation by co-stimulatory signals such as B7 binding to CD28, leading to induction of T-cell anergy or tolerance. Immune system diseases include, but are not limited to, autoimmune diseases, immunoproliferative diseases, and immune disorders associated with graft transplantation discussed above.

[0058] Another embodiment provides methods for inducing tolerance in a subject having immune disorders associated with graft transplantation by administering a therapeutic composition comprising soluble CTLA4 mutant molecules disclosed herein.

[0059] The soluble CTLA4 mutant molecules disclosed herein exhibit inhibitory properties *in vivo*. Under conditions where T-cell/B7-positive cell interactions, for example T cell/B cell interactions, are occurring as a result of contact between T cells and B7-positive cells, binding of introduced CTLA4 mutant molecules to react to B7-

positive cells, for example B cells, may interfere, i.e., inhibit, the T cell/ B7-positive cell interactions resulting in regulation of immune responses.

[0060] Another embodiment provides methods for regulating immune responses. Immune responses downregulated (reduced) by the soluble CTLA4 mutant molecules disclosed herein may be by way of inhibiting or blocking an immune response already in progress or may involve preventing the induction of an immune response. The soluble CTLA4 mutant molecules disclosed herein may inhibit the functions of activated T cells, such as T lymphocyte proliferation, cytokine secretion and/or cytokine production, by suppressing T cell responses or by inducing specific tolerance in T cells, or both. Further, the soluble CTLA4 mutant molecules disclosed herein, interfering with the CTLA4/CD28/B7 pathway may inhibit T-cell proliferation and/or cytokine secretion, and thus result in reduced tissue destruction and induction of T-cell unresponsiveness or anergy.

[0061] CTLA4 mutant molecules comprise at least the extracellular domain of CTLA4, or portions thereof that bind CD80 and/or CD86. The extracellular portion of a CTLA4 mutant molecule comprises an amino acid sequence starting with methionine at position +1 through aspartic acid at position +124 (figure 7,SEQ ID NOS: 3 and 4; or figure 8, SEQ ID NOS: 5 and 6). Alternatively, the extracellular portion of the CTLA4 can comprise an amino acid sequence starting with alanine at position –1 through aspartic acid at position +124 (Figure 7, SEQ ID NOS: 3 and 4; or figure 8, SEQ ID NOS: 5 and 6).

[0062] In one embodiment, the soluble CTLA4 mutant molecule is a fusion protein comprising the extracellular domain of CTLA4 having one or more mutations in a region of an amino acid sequence beginning with serine at +25 and ending with arginine at +33 (S25-R33). For example, the alanine at position +29 of wild type CTLA4 can be substituted with tyrosine (codons: UAU, UAC). Alternatively, alanine can be substituted with leucine (codons: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG), phenylalanine (codons: UUU, UUC), tryptophan (codon: UGG), or threonine (codons: ACU, ACC, ACA, ACG). As persons skilled in the art will readily understand, the uracil (U) nucleotide of the RNA sequence corresponds to the thymine (T) nucleotide of the DNA sequence.

[0063] In another embodiment, the soluble CTLA4 mutant molecule is a fusion protein comprising the extracellular domain of CTLA4 having one or more mutations in or near a region of an amino acid sequence beginning with methionine at +97 and ending with glycine at +107 (M97-G107). For example, leucine at position +104 of wild type CTLA4 can be substituted with glutamic acid (codons: GAA, GAG). A CTLA4 mutant molecule having this substitution is referred to herein as L104EIg (Figure 8, SEQ ID NOS: 5 and 6).

[0064] In yet another embodiment, the soluble CTLA4 mutant molecule is a fusion protein comprising the extracellular domain of CTLA4 having one or more mutations in the S25-R33 and M97-G107 regions. For example, in one embodiment, a CTLA4 mutant molecule comprises tyrosine at position +29 instead of alanine; and glutamic acid at position +104 instead of leucine. A CTLA4 mutant molecule having these substitutions is referred to herein as L104EA29YIg (Figure 7, SEQ ID NOS: 3 and 4). The nucleic acid molecule that encodes L104EA29YIg is contained in pD16 L104EA29YIg and was deposited on June 19, 2000 with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manasas, VA 20110-2209 (ATCC No. PTA-2104). The pD16 L104EA29YIg vector is a derivative of the pcDNA3 vector (INVITROGEN).

[0065] The invention further provides a soluble CTLA4 mutant molecule comprising an extracellular domain of a CTLA4 mutant as shown in Figure 7(SEQ ID NOS: 3 and 4) or figure 8(SEQ ID NOS: 5 and 6) or portion(s) thereof, and a moiety that alters the solubility, affinity and/or valency of the CTLA4 mutant molecule.

[0066] In accordance with a practice of the invention, the moiety can be an immunoglobulin constant region or portion thereof, e.g., one or more of a CH1 domain, hinge, CH2 domain or CH3 domain. For *in vivo* use, it is preferred that the immunoglobulin constant region does not elicit a detrimental immune response in the subject. For example, in clinical protocols, it may be preferred that mutant molecules include human or monkey immunoglobulin constant regions or portion thereof. Examples of suitable immunoglobulin domains include, but are not limited to, IgCγ1 (IgCgamma1), IgCγ2 (IgCgamma2), IgCγ3 (IgCgamma3), IgCγ4 (IgCgamma4), IgCμ (IgCmu), IgCα1 (IgCalpha1), IgCα2 (IgCalpha2), IgCδ (IgCdelta) or

IgCε (IgCepsilon). Other isotypes are possible. Further, other immunoglobulin constant regions or portion thereof are possible (preferably other weakly or non-immunogenic immunoglobulin constant regions or portion thereof).

[0067] For clinical protocols, it is preferred that the immunoglobulin moiety does not elicit a detrimental immune response in a subject. The preferred moiety is the immunoglobulin constant region or portion thereof, including the human or monkey immunoglobulin constant regions or portion thereof. One example of a suitable immunoglobulin region is human Cγ1, including the hinge, CH2 and CH3 regions which can mediate effector functions such as binding to Fc receptors, mediating complement-dependent cytotoxicity (CDC), or mediate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). The immunoglobulin moiety may have one or more mutations therein, (e.g., in the CH2 domain, to reduce effector functions such as CDC or ADCC) where the mutation modulates the binding capability of the immunoglobulin to its ligand, by increasing or decreasing the binding capability of the immunoglobulin to Fc receptors. For example, mutations in the immunoglobulin moiety may include changes in any or all its cysteine residues within the hinge domain, for example, the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine (Figure 9, SEQ ID NO: 8). The immunoglobulin moiety may also include the proline at position +148 substituted with a serine, as shown in Figure 9 (SEQ ID NO: 8). Further, the mutations in the immunoglobulin moiety may include having the leucine at position +144 substituted with phenylalanine, leucine at position +145 substituted with glutamic acid, or glycine at position +147 substituted with alanine. Examples of immunoglobuling moieties include those described and disclosed in U.S. Patent Publications Nos. 2002/0114814 A1 and 2004/0151725 A1, U.S. Patents Nos. 6,444,792 and 6,750,334, and WO 97/28267.

[0068] Other moieties include polypeptide tags. Examples of suitable tags include but are not limited to the p97 molecule, env gp120 molecule, E7 molecule, and ova molecule (Dash, B., et al. (1994) *J. Gen. Virol.* 75:1389-97; Ikeda, T., et al. (1994) *Gene* 138:193-6; Falk, K., et al. (1993) *Cell. Immunol.* 150:447-52; Fujisaka, K. et al. (1994) *Virology* 204:789-93). Other molecules for use as tags are possible (Gerard, C. et al. (1994) *Neuroscience* 62:721-739; Byrn, R. et al. *J. Virol.* (1989)

63:4370-4375; Smith, D. et al., (1987) *Science* 238:1704-1707; Lasky, L., (1996) *Science* 233:209-212).

[0069] The invention further provides soluble mutant CTLA4Ig fusion proteins preferentially more reactive with the CD80 and/or CD86 antigen compared to wild type CTLA4. One example is L104EA29YIg as shown in Figure 7 (SEQ ID NOS: 3 and 4).

[0070] In another embodiment, the soluble CTLA4 mutant molecule includes a junction amino acid residue, which is located between the CTLA4 portion and the immunoglobulin portion. The junction amino acid can be any amino acid, including glutamine. The junction amino acid can be introduced by molecular or chemical synthesis methods known in the art.

[0071] In another embodiment, the soluble CTLA4 mutant molecule includes the immunoglobulin portion (e.g., hinge, CH2 and CH3 domains), where any or all of the cysteine residues, within the hinge domain of the immunoglobulin portion are substituted with serine, for example, the cysteines at positions +130, +136, or +139 (figure 7, SEQ ID NOS: 3 and 4; or figure 8, SEQ ID NOS: 5 and 6). The mutant molecule may also include the proline at position +148 substituted with a serine, as shown in Figure 7 (SEQ ID NOS: 3 and 4) or figure 8 (SEQ ID NOS: 5 and 6).

[0072] The soluble CTLA4 mutant molecule can include a signal peptide sequence linked to the N-terminal end of the extracellular domain of the CTLA4 portion of the mutant molecule. The signal peptide can be any sequence that will permit secretion of the mutant molecule, including the signal peptide from oncostatin M (Malik, et al., (1989) *Molec. Cell. Biol.* 9: 2847-2853), or CD5 (Jones, N. H. et al., (1986) *Nature* 323:346-349), or the signal peptide from any extracellular protein.

[0073] The mutant molecule can include the oncostatin M signal peptide linked at the N-terminal end of the extracellular domain of CTLA4, and the human immunoglobulin molecule (e.g., hinge, CH2 and CH3) linked to the C-terminal end of the extracellular domain of CTLA4. This molecule includes the oncostatin M signal peptide encompassing an amino acid sequence having methionine at position –26 through alanine at position –1, the CTLA4 portion encompassing an amino acid sequence having methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and the immunoglobulin

portion encompassing an amino acid sequence having glutamic acid at position +126 through lysine at position +357 or glycine at position +356.

[0074] The soluble CTLA4 mutant molecules of the invention can be obtained by molecular or chemical synthesis methods. The molecular methods may include the following steps: introducing a suitable host cell with a nucleic acid molecule that expresses and encodes the soluble CTLA4 mutant molecule; culturing the host cell so introduced under conditions that permit the host cell to express the mutant molecules; and isolating the expressed mutant molecules. The signal peptide portion of the mutant molecule permits the protein molecules to be expressed on the cell surface and to be secreted by the host cell. The translated mutant molecules can undergo post-translational modification, involving cleavage of the signal peptide to produce a mature protein having the CTLA4 and the immunoglobulin portions. The cleavage may occur after the alanine at position –1, resulting in a mature mutant molecule having methionine at position +1 as the first amino acid (Figure 7, SEQ ID NOS: 3 and 4; or figure 8, SEQ ID NOS: 5 and 6). Alternatively, the cleavage may occur after the methionine at position –2, resulting in a mature mutant molecule having alanine at position –1 as the first amino acid.

[0075] One skilled in the art would be aware that expression of L104EA29YIg in mammalian cells can result in the production of N- and C- terminal variants, such that the proteins produced can have the amino acid sequence of residues: (i) +1 to +357, (ii) -1 to +357; (iii) +1 to +356 or (iv) -1 to 356 (Figure 7, SEQ ID NOS: 3 and 4; or figure 8, SEQ ID NOS: 5 and 6) .

[0076] A preferred embodiment is a soluble CTLA4 mutant molecule having the extracellular domain of human CTLA4 linked to all or a portion of a human immunoglobulin molecule (e.g., hinge, CH2 and CH3). This preferred molecule includes the CTLA4 portion of the soluble molecule encompassing an amino acid sequence having methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and the immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357 or glycine at position +356. The portion having the extracellular domain of CTLA4 is mutated so that alanine at position +29 is substituted with tyrosine and leucine at position +104 is substituted with glutamic acid. The immunoglobulin portion of the

mutant molecule can be mutated, so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine, and the proline at position +148 is substituted with serine. This mutant molecule is designated herein as L104EA29YIg (Figure 7, SEQ ID NOS: 3 and 4).

[0077] Another embodiment of L104EA29YIg is a mutant molecule having an amino acid sequence having alanine at position -1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and the immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 (e.g., +126 through lysine at position +357 or glycine at position +356). The portion having the extracellular domain of CTLA4 is mutated so that alanine at position +29 is replaced with tyrosine; and leucine at position +104 is replaced with glutamic acid. The immunoglobulin portion of the mutant molecule is mutated so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are replaced with serine, and the proline at position +148 is replaced with serine. This mutant molecule is designated herein as L104EA29YIg (Figure 7, SEQ ID NOS: 3 and 4). After the signal sequence has been cleaved, L104EA29YIg can either begin with a methionine at position +1, or begin with alanine at position -1.

[0078] Another mutant molecule of the invention is a soluble CTLA4 mutant molecule having the extracellular domain of human CTLA4 linked to the human immunoglobulin molecule (e.g., hinge, CH2 and CH3). This molecule includes the portion of the amino acid sequence encoding CTLA4 starting with methionine at position +1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and the immunoglobulin portion encompassing an amino acid sequence having glutamic acid at position +126 through lysine at position +357 or glycine at position +356. The portion having the extracellular domain of CTLA4 is mutated so that leucine at position +104 is substituted with glutamic acid. The hinge portion of the mutant molecule is mutated so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine, and the proline at position +148 is substituted with serine. This mutant molecule is designated herein as L104EIg (Figure 8, SEQ ID NOS: 5 and 6).

[0079] Alternatively, an embodiment of L104EIg is a soluble CTLA4 mutant molecule having an extracellular domain of human CTLA4 linked to a human

immunoglobulin molecule (e.g., hinge, CH2 and CH3). This preferred molecule includes the CTLA4 portion encompassing an amino acid sequence beginning with alanine at position -1 through aspartic acid at position +124, a junction amino acid residue glutamine at position +125, and the immunoglobulin portion encompassing glutamic acid at position +126 through lysine at position +357 or glycine at position +356. The portion having the extracellular domain of CTLA4 is mutated so that leucine at position +104 is substituted with glutamic acid. The hinge portion of the mutant molecule is mutated so that the cysteines at positions +130, +136, and +139 are substituted with serine, and the proline at position +148 is substituted with serine. This mutant molecule is designated herein as L104EIg (Figure 8, SEQ ID NOS: 5 and 6).

[0080] Further, the invention provides a soluble CTLA4 mutant molecule having: (a) a first amino acid sequence of a membrane glycoprotein, e.g., CD28, CD86, CD80, CD40, and gp39, which blocks T cell proliferation, fused to a second amino acid sequence; (b) the second amino acid sequence being a fragment of the extracellular domain of mutant CTLA4 which blocks T cell proliferation, such as, for example an amino acid molecule comprising methionine at position +1 through aspartic acid at position +124 (Figure 7, SEQ ID NOS: 3 and 4; or figure 8, SEQ ID NOS: 5 and 6); and (c) a third amino acid sequence which acts as an identification tag or enhances solubility of the molecule. For example, the third amino acid sequence can consist essentially of amino acid residues of the hinge, CH2 and CH3 regions of a non-immunogenic immunoglobulin molecule. Examples of suitable immunoglobulin molecules include, but are not limited to, human or monkey immunoglobulin, e.g., IgCγ1. Other isotypes are also possible.

[0081] The present invention also provides a method for treating an immune disorder associated with graft transplantation by administering to a subject an effective dose of a CTLA4 mutant molecule with an extracellular domain of CTLA4 as shown in SEQ ID NO:8 beginning with alanine at position 26 or methionine at position 27 and ending with aspartic acid at position 150, or a portion thereof. Additionally, in the extracellular domain or portion thereof an alanine at position 55 is substituted with a tyrosine, and a leucine at position 130 is substituted with a glutamic acid. Further the administration regimen comprises an early phase regimen, wherein

the early phase regimen may range from the first 3 to 6 months post-transplantation and involves administration that initially is more frequent than monthly.

[0082] Additionally, the present invention provides a method for treating an immune disorder associated with graft transplantation by administering to a subject an effective dose of a CTLA4 mutant molecule with an amino acid sequence beginning with methionine at position 27 and ending with aspartic acid at position 150 of SEQ ID NO:4, or with an amino acid sequence beginning with alanine at position 26 and ending with aspartic acid at position 150 of SEQ ID NO:4. Further the CTLA4 mutant molecule administration regimen comprises an early phase regimen, wherein the early phase regimen may range from the first 3 to 6 months post-transplantation and involves administration that initially is more frequent than monthly.

[0083] The invention further provides nucleic acid molecules comprising nucleotide sequences encoding the amino acid sequences corresponding to the soluble CTLA4 mutant molecules of the invention. In one embodiment, the nucleic acid molecule is a DNA (e.g., cDNA) or a hybrid thereof. Alternatively, the nucleic acid molecules are RNA or a hybrids thereof.

[0084] Additionally, the invention provides a vector, which comprises the nucleotide sequences of the invention. A host vector system is also provided. The host vector system comprises the vector of the invention in a suitable host cell. Examples of suitable host cells include, but are not limited to, prokaryotic and eukaryotic cells.

[0085] The invention includes pharmaceutical compositions for use in the treatment of immune disorders associated with graft transplantation comprising pharmaceutically effective doses of soluble CTLA4 mutant molecules. In certain embodiments, the immune disorders associated with graft transplantation are mediated by CD28- and/or CTLA4-positive cell interactions with CD80 and/or CD86 positive cells. The soluble CTLA4 mutant molecules are preferably CTLA4 molecules having one or more mutations in the extracellular domain of CTLA4. The pharmaceutical composition can include soluble CTLA4 mutant protein molecules and/or nucleic acid molecules, and/or vectors encoding the molecules. In preferred embodiments, the soluble CTLA4 mutant molecules have the amino acid sequence of the extracellular domain of CTLA4 as shown in either Figures 7 (SEQ ID NOS: 3 and

4)or 8 (SEQ ID NOS: 5 and 6), L104EA29Y or L104E, respectively. Even more preferably, the soluble CTLA4 mutant molecule is L104EA29YIg as disclosed herein. The compositions may additionally include other therapeutic agents, including, but not limited to, drug toxins, enzymes, antibodies, or conjugates.

[0086] The pharmaceutical compositions also preferably include suitable carriers and adjuvants which include any material which when combined with the molecule of the invention (e.g., a soluble CTLA4 mutant molecule, such as, L104EA29Y or L104E) retains the molecule's activity and is non-reactive with the subject's immune system. Examples of suitable carriers and adjuvants include, but are not limited to, human serum albumin; ion exchangers; alumina; lecithin; buffer substances, such as phosphates; glycine; sorbic acid; potassium sorbate; and salts or electrolytes, such as protamine sulfate. Other examples include any of the standard pharmaceutical carriers such as a phosphate buffered saline solution; water; emulsions, such as oil/water emulsion; and various types of wetting agents. Other carriers may also include sterile solutions; tablets, including coated tablets and capsules. Typically such carriers contain excipients such as starch, milk, sugar, certain types of clay, gelatin, stearic acid or salts thereof, magnesium or calcium stearate, talc, vegetable fats or oils, gums, glycols, or other known excipients. Such carriers may also include flavor and color additives or other ingredients. Compositions comprising such carriers are formulated by well known conventional methods. Such compositions may also be formulated within various lipid compositions, such as, for example, liposomes as well as in various polymeric compositions, such as polymer microspheres.

[0087] The pharmaceutical compositions of the invention can be administered using conventional modes of administration including, but not limited to, intravenous (i.v.) administration, intraperitoneal (i.p.) administration, intramuscular (i.m.) administration, subcutaneous administration, oral administration, administration as a suppository, or as a topical contact, or the implantation of a slow-release device such as a miniosmotic pump, to the subject.

[0088] The pharmaceutical compositions of the invention may be in a variety of dosage forms, which include, but are not limited to, liquid solutions or suspensions, tablets, pills, powders, suppositories, polymeric microcapsules or microvesicles,

liposomes, and injectable or infusible solutions. The preferred form depends upon the mode of administration and the therapeutic application.

[0089] A typical pharmaceutical composition of the invention for intravenous (i.v.) administration is listed below.

Composition of lyophilized L104EA29YIg 100mg/vial drug product

Component	Amount/Vial (mg)[a]
L104EA29YIg	110[a]
Sucrose	220
Sodium Phosphate Monobasic Monohydrate	15.18
Sodium Chloride	2.55
1N Sodium Hydroxide	Adjust to pH 7.5
1N Hydrochloric Acid	Adjust to pH 7.5

[a] Each vial contains 10% overfill for vial, needle and syringe holdup of the reconstituted solution.

[0090] The lyophilized drug product may be constituted with an aqueous carrier. The aqueous carrier of interest herein is one which is pharmaceutically acceptable (safe and non-toxic for administration to a human) and is useful for the preparation of a liquid formulation, after lyophilization. Typically, the lyophilized drug product is constituted to about 25mg/ml with 10 ml of either Sterile Water for Injection, USP (SWFI) or 0.9% Sodium Chloride Injection, USP. The constituted solution is further diluted to drug product concentrations between 1 and 10 mg/ml with 0.9% Sodium Chloride Injection, USP. The diluted drug product for injection is isotonic and suitable for administration by intravenous infusion.

[0091] A surfactant may be added to the formulation in an amount sufficient to reduce or prevent the interaction of the constituted drug product with a siliconized syringe.

[0092] The most effective mode of administration and dosage regimen for the compositions of this invention depends upon the severity and course of the disease, the patient's health and response to treatment and the judgment of the treating physician. Accordingly, the dosages (also known as doses) of the compositions should be titrated to the individual patient.

[0093] The soluble CTLA4 mutant molecules may be administered to a subject in an amount, at a frequency over a period of a time (e.g., length of time and/or multiple times) sufficient to block endogenous B7 (e.g., CD80 and/or CD86) molecules from binding their respective ligands, in the subject. Blockage of endogenous B7/ligand binding thereby inhibits interactions between B7-positive cells (e.g., CD80- and/or CD86-positive cells) with CD28- and/or CTLA4-positive cells. Dosage of a therapeutic agent is dependant upon many factors including, but not limited to, the type of tissue affected, the type of immune disorder associated with graft transplantation being treated, the severity of the disease, a subject's health, and a subject's response to the treatment with the agents.

[0094] Doses of the molecules or the pharmaceutical compositions of the invention are based on body weight, and administration regimens may be dictated by the target serum trough profiles. Typically, target trough serum concentration of CTLA4 mutant molecules of the invention between about 3μg/mL and about 30μg/mL over the first 3 to 6 months post-transplant will be sufficient to maintain function of the allograft, preferably between about 5μg/mL and about 20 μg/mL. Typically, target trough serum concentration of CTLA4 mutant molecules of the invention during the maintenance phase are between about 0.2 μg/mL and about 3μg/mL, preferably between about 0.25μg/mL and about 2.5μg/mL.

[0095] The CTLA4 mutant molecules of the invention may be administered in an amount between about 0.1 to about 20.0 mg/kg weight of the patient, typically between about 1.0 to about 15.0 mg/kg. For example, L104EA29Y may be administered at 10 mg/kg weight of the patient during the early phase, high risk period that follows transplantation and decreased to 5 mg/kg weight of the patient for a maintenance dosage.

[0096] Administration of the molecules or pharmaceutical compositions of the invention can be performed over various times. Typically, administration regimens include an early phase, in which doses are higher and the frequency of administration is increased during the period of greatest immunologic risk, followed by a maintenance phase. The early phase regimen may range from the first 3 to 6 months post-transplantation and involves administration that initially is more frequent than monthly, preferably as frequently as daily, weekly or every two weeks depending on

the immunologic risk and/or target trough serum concentration. The maintenance phase begins when the early phase ends and involves administration that is not more frequent than monthly, and lasts for as long as needed, typically for as long as the patient retains the transplant. As used herein, day 1 is defined as the day of the transplant or the first day of treatment with molecules or pharmaceutical compositions of the invention.

[0097] The dosage of CTLA4 mutant molecules of the invention in the early phase is about 8 to about 12 mg/kg weight of the patient, preferably about 10 mg/kg. The dosage of CTLA4 mutant molecules of the invention in the maintenance phase is about 3 to about 7 mg/kg weight of the patient, preferably about 5 mg/kg.

[0098] The early phase may range from the first 3 to 6 months post-transplantation. The administration regimen during early phase may vary depending on the status of the recipient and/or graft. For example, a more intensive early phase regimen would administer a higher dose of the molecules or the pharmaceutical compositions of the invention on day 1, day 5, week 2 visit (e.g., day 13-17), then every two weeks for the first 3 months (e.g., on week 4 visit, week 6 visit, week 8 visit, week 10 visit, and week 12 visit), followed by monthly administration through month 6 visit (e.g., on month 4 visit, month 5 visit, and month 6 visit). An example of a typical more intensive early phase regimen is administration of 10mg/kg weight of the patient of L104EA29YIg at days1, 5, 15, 29, 43, 57, 71, 85, 113, 141 and 169. A less intensive regimen, for example, would administer the molecules or the pharmaceutical compositions of the invention on day 1, week 2 visit, week 4 visit, then monthly through month 3 visit. An example of a typical less intensive early phase regimen is administration of 10mg/kg weight of the patient of L104EA29YIg on days1, 15, 29, 57 and 85.

[0099] Typically, an early phase is followed by a maintenance phase where lower doses of the molecules or pharmaceutical compositions of the invention are administered at one to two month intervals for as long as needed, typically for as long as the patient retains the transplant. An example of the maintenance phase for the more intensive regimen described above includes monthly administration of 5mg/kg weight of the patient of L104EA29YIg starting at month 7 visit. While an example of the maintenance phase for the less intensive regimen above would include monthly

administration of 5mg/kg weight of the patient of L104EA29YIg starting at month 4 visit.

[00100] Alternatively, one knowledgeable in the art would be able to modify the administration regimen in response to the patients risk status and/or response to the therapy post transplantation. For example, the early phase of the less intensive regimen described above could be modified by adding administration day 5 to the regimen, thereby increasing the frequency of administration during the period of greatest immunologic risk.

[00101] As used herein, "four weeks," "month", "months" or "monthly" refers to a period of 28 ± 5 days. As used herein, "two weeks" refers to a period of 14 ± 3 days.

[00102] Flexibility in the administration regimens is required to facilitate administration scheduling in the lives of transplant recipients, while maintaining the target trough profile of the CTLA4 mutant molecules of the invention. Permitted windows for administering the doses may be as follows:

Visit	Visit window
Day 1 and day 5	96 hours apart ± 6 hours
Week 2	Target date ± 2 days
Week 4 – Month 6	Target date ± 3 days
from Month 7 thereafter	Target date ± 5 days

[00103] The target date is a result of adding the desired duration to the previous actual visit date. The desired duration for the week 2 visit is 10 days. The desired duration is 14 days for a visit planned for two weeks from the previous visit, e.g., a week 6 visit following a week 4 visit. The desired duration is 28 days for a visit planned for a month or four week from the previous visit, e.g., a month 4 visit following a month 3 visit. The desired duration is 56 days for a visit planned for two months from the previous visit, e.g., a month 8 visit after a month 6 visit. For example, a day 15 actual visit date plus 14 days results in a week 4 target date of day 29. Based on the visit windows above, the administration may occur on day 29 ± 3 days. Should the administration occur on day 26, that day becomes the actual visit date utilized for the calculation of the next target date.

[00104] Low risk of acute rejection recipients typically include those who receive transplants from living related donors and well matched recipient/donors. High risk of acute rejection recipients typically include those who receive transplants from marginal donors or re-transplants, have high panel reactive antibodies or are African American.

[00105] In addition to the immediate risk of acute transplant rejection, the use of maintenance drugs such as calcineurin inhibitors and steroids over the long term result in toxicities that negatively impact long-term outcomes and patient quality of life. For example, side effects of maintenance drugs include nephrotoxicity (CAN) resulting in declining renal function and/or graft loss, and cardiovascular and metabolic diseases such as hypertension, hyperlipidemia and diabetes which result in cardiovascular disease and death. Additonal side effects include hirsuitism, alpecia, gingival hyperplasia, tremor, neurotoxicity and bone loss which result in non-compliance and reduced quality of life. The molecules or pharmaceutical compositions of the invention maybe used to avoid these outcomes, to reduce incidence, development and/or progression of these outcomes when treating immune disorders associated with graft transplantation, or to treat immune disorders associated with graft transplantation in subjects at risk of these outcomes. The molecules or pharmaceutical compositions of the invention maybe used to improve renal function such as measured by GFR.

[00106] The administration of the molecules or pharmaceutical compositions of the invention can be via a 30 minute to one or more hour intravenous infusion. Alternatively, single to multiple subcutaneous injections can deliver the required dosage. Typically, a 30 minute intravenous infusion is the administration route utilized during the early phase of treatment while the patient is in the hospital and/or making scheduled visits to the healthcare professional for monitoring. The subcutaneous injection is the typical administration mode utilized during the maintenance phase, thereby allowing the patient to return to their normal schedule by decreasing the visits to a healthcare professional for intravenous infusions.

[00107] An alternate embodiment of the invention provides a method for treating an immune disorder associated with graft transplantation in subjects that have received an alternate immunosuppressive therapy post transplantation. The subjects

on an alternate pharmaceutical immunosuppressive therapy may change or switch or convert to a therapy including the molecules or pharmaceutical compositions of the present invention, thereby eliminating the alternate drug. Typically the pharmaceutical that is to be eliminated is ramped down over an appropriate period of time, based on the prescribing instructions of that specific drug, while at the same time the molecules or pharmaceutical composition of the instant invention is administered more frequently than monthly. Once the subject is completely off the alternate drug, the subject may return to a standard maintenance regimen utilizing the molecules or pharmaceutical compositions of the instant invention. For example, a subject receiving CsA/MMF ± corticosteroid regimen may switch CsA with L104EA29YIg for a L104EA29YIg/MMF± corticosteroid regimen. The conversion administration schedule may include a ramping down of the dose of CsA over two months and the administration of 5mg/kg of L104EA29YIg every two weeks during those two months. Once the CsA is eliminated, the subject would then enter the maintenance phase and continue to receive 5mg/kg every 4 or 8 weeks for the duration of the treatment in the absence of CsA.

[00108] One embodiment provides appropriate dosages for a soluble CTLA4 mutant molecule disclosed herein that is effective for blocking B7 interactions with its ligand and/or treating an immune system disease. For example the dosage may be based on body weight, and administration regimens may be dictated by the target serum trough profiles. For example, the effective target trough serum concentrations of soluble CTLA4 mutant molecules disclosed herein to treat an immune system disease may be between about 0.2μg/mL and about 30μg/mL. Alternatively, the soluble CTLA4 mutant molecules disclosed herein may be administered in an amount between about 0.1 to about 20.0 mg/kg weight of the patient to treat immune system diseases.

[00109] The present invention further provides methods for treating immune disorders associated with graft transplantation. In particular embodiments, the immune disorders associated with graft transplantation are mediated by CD28- and/or CTLA4-positive cell interactions with CD80/CD86-positive cells. In a further embodiment, T cell interactions are inhibited. These methods comprise administering to a subject the soluble CTLA4 mutant molecules of the invention to regulate T cell

interactions with the CD80- and/or CD86-positive cells. Examples of immune disorders associated with graft transplantation are discussed above.

[00110] The present invention further provides a method for prophylaxis of or inhibiting or preventing solid organ, tissue, cell and/or external anatomy transplant rejections by a subject, the subject being a recipient of transplant solid organ, tissue, cell and/or external anatomy. Typically, in transplants, rejection of the graft is initiated through its recognition as foreign by T cells, followed by an immune response that destroys the graft. The soluble CTLA4 mutant molecules of this invention, by inhibiting T lymphocyte proliferation and/or cytokine secretion, may result in reduced tissue destruction and induction of antigen-specific T cell unresponsiveness which may result in long-term graft acceptance.

[00111] The study described in Example 3 compared the efficacy and safety of L104EA29YIg as a maintenance immunosuppressant with cyclosporineA (CsA) over 12 months when used as part of a CNI-free combination regimen consisting of basiliximab(Simulect®; Novartis) induction, mycophenolate mofetil (MMF; CellCept®; Roche), and corticosteroids in renal transplant recipients. Objectives included assessment of the incidence of acute rejection (biopsy-confirmed or presumed) at 6 months and 1 year; measured glomerular filtration rate (GFR) via iohexol clearance at 1, 6, and 12 months; parameters of hypertension including serum cholesterol and triglycerides; and overall safety. Other pre-specified analyses included patient death or graft loss at 1 year; the severity of acute rejection; the incidence of post-transplant diabetes mellitus [defined as any therapy required for hyperglycemia for $\geq$4 weeks, or a hemoglobin A1C (HbA1c) >7%, in patients not previously known to be diabetic]; calculated GFR, using the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD, Levey AS, Bosch JP, Lewis JP, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med 1999;130:461-470), Jelliffe (RW. Creatinine clearance: Bedside estimate. Ann Inter Med. 1973;79:604-605), Cockcroft-Gault (Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976;16:31-41), and Nankivell (Nankivell BJ, Gruenewald SM, Allen RD, Chapman JR. Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. Transplantation. 1995;

59(12):1683-1689) formulas; pharmacokinetics and immunogenicity. Diagnosis and treatment of acute rejection (AR) was based on the Banff 97 criteria and grade (Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int 1999;55(2):713-23.). Post hoc analysis was conducted of the incidence of chronic allograft nephropathy (CAN).

[00112] This 12-month study demonstrated that L104EA29YIg-based maintenance therapy conferred equivalent efficacy in preventing AR and similar patient and graft survival compared with CsA. In addition, L104EA29YIg demonstrated significant improvements in renal function and reductions in CAN compared with CsA-based maintenance immunosuppression. L104EA29YIg was safe and well tolerated and was not associated with typical CNI-related toxicities.

[00113] Improved renal function during the first post-transplant year has been shown to correlate with better long-term outcomes (Hariharan S, McBride MA, Cherikh WS, Tolleris CB, Bresnahan BA, Johnson CP. Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival. Kidney Int 2002;62(1):311-8) since the long-term use of CNIs is limited by their nephrotoxicity (Danovitch GM. Immunosuppressive medications for renal transplantation: a multiple choice question. Kidney Int 2001;59(1):388-402), which leads to reduced graft function and renal insufficiency with all its attendant problems. Thus, perhaps the most notable findings seen with L104EA29YIg treatment are the superior GFRs coupled with the 12-month renal histology showing reductions in development and/or progression of CAN compared with CsA. This was a surprising outcome and the first time that a finding of this sort has been shown in a randomized Phase II trial of an immunosuppressive therapy. Since preservation of the nephron mass, by prevention of immunologic, cardiovascular and/or metabolic insults contributes to beneficial effects on both patient and graft survival it is possible that L104EA29YIg may be associated with better long-term outcomes.

[00114] These issues are particularly important with the increasing use of organs from extended criteria donors or recipients since these are particularly susceptible to CNI-related toxicity. Decreasing the incidence of CV and metabolic events in patients who have undergone renal transplant is also central to improving long-term outcomes.

[00115] The molecules or pharmaceutical compositions of the invention maybe used to treat immune disorders associated with graft transplantation in subjects who are extended criteria recipients and/or who are receiving grafts from extended criteria donors. These criteria, which are based in part on criteria issued by the United Network of Organ Sharing (UNOS), may include one or more of the following: donor age less than 10 or greater than or equal to 60 years; donor after cardiac death; anticipated cold-ischemic time of donor organ greater than or equal to 24 hours; subjects undergoing first time transplant with a current PRA ≥ 50%, or undergoing retransplantation with PRA ≥ 30%; subjects with previous graft loss due to acute rejection during the first 6 months after transplant; subjects with positive T-cell lymphocytotoxic crossmatch using donor lymphocytes and recipient serum; subjects with HIV infection; subjects with active tuberculosis requiring treatment within the previous 3 years; or other criteria issued by the United Network of Organ Sharing (UNOS). An example of possible extended criteria for a donor and/or the donor kidney includes at least 1 of the following extended criteria for organ donation a) Donor age ≥60 years **OR** b) Donor age 50 – 59 years and 1 of the following: (i) Cerebrovascular accident (CVA) + hypertension + SCr > 1.5 mg/dL **OR** (ii) CVA + hypertension **OR** (iii)CVA + SCr > 1.5 mg/dL **OR** (iv) Hypertension + SCr > 1.5 mg/dL **OR** c) CIT ≥24 hours, donor age > 10 years **OR** d) Donor with cardiac death (non-heart beating donor).

[00116] The present invention also provides methods for inhibiting graft versus host disease in a subject. This method comprises administering to the subject a soluble CTLA4 mutant molecule of the invention, alone or together, concomitantly or sequentially, with further additional ligands, reactive with IL-2, IL-2R, IL-4, or γ-interferon. For example, a soluble CTLA mutant molecule of this invention may be administered to a bone marrow transplant recipient to inhibit the alloreactivity of donor T cells. Alternatively, donor T cells within a bone marrow graft may be tolerized to a recipient's alloantigens *ex vivo* prior to transplantation.

[00117] The soluble CTLA4 mutant molecules of the invention, for example L104EA29Y, may be administered as the sole active ingredient or together, concomitantly or sequentially, with one or more other drugs in immunomodulating

regimens, immunosuppressive agents and/or other anti-inflammatory agents e.g., for the treatment, prevention or inhibition or prophylaxis of allograft or xenograft acute or chronic rejection or to induce tolerance. For example, it may be used in combination with a calcineurin inhibitor (e.g., cyclosporin A or FK506); an immunosuppressive macrolide (e.g., tacrolimus, rapamycin, sirolimus) or a derivative thereof (e.g., 40-O-(2-hydroxy)ethyl-rapamycin, sirolimus, centican); a lymphocyte homing agent (e.g., FTY720) or an analog thereof (FK778, Jak-3), corticosteroids; cyclophosphamide; azathioprene; methotrexate; leflunomide or an analog thereof; mizoribine; mycophenolic acid; mycophenolate mofetil; 15-deoxyspergualine or an analog thereof; immunosuppressive monoclonal antibodies (e.g., basiliximab, daclizumab), ligands, monoclonal antibodies or antibody fragments thereof to leukocyte receptors(e.g., MHC, CD2, CD3, CD4, CD 11a/CD18, CD7, CD25, CD 27, B7, CD40, CD45, CD58, CD 137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BBor their ligands); or other immunomodulatory compounds(e.g., CTLA4/CD28-Ig), or other adhesion molecule inhibitors(e.g., mAbs) or low molecular weight inhibitors including LFA-1 antagonists, Selectin antagonists and VLA-4 antagonists. The compound is particularly useful in combination with a compound which interferes with CD40 and its ligand (e.g., antibodies to CD40 and antibodies to CD40-L), such as Chi220 (US Patent 6,051,228) e.g., in the above described indications, e.g the induction of tolerance.

[00118] Where the soluble CTLA4 mutant molecules of the invention are administered concomitantly or sequentially in conjunction with other immunosuppressive / immunomodulatory therapy, e.g as herein specified, dosages of the co-administered immunosuppressant, or immunomodulatory compound will of course vary depending on the type of co-drug employed, e.g., whether it is a steroid or a cyclosporine, on the specific drug employed, on the condition being treated and so forth.

[00119] In accordance with the foregoing, the present invention further provides therapeutic combinations, e.g., a kit, e.g., for use in any method as defined above, comprising a L104EA29YIg, in free form or in pharmaceutically acceptable salt form, to be used concomitantly or in sequence with at least one pharmaceutical composition

comprising an immunosuppressant, immunomodulatory or anti-inflammatory drug. The kit may comprise instructions for its administration.

[00120] In accordance with the foregoing the present invention provides in a yet further aspect methods as defined above comprising co-administration, e.g., concomitantly or in sequence, of a therapeutically effective dose of soluble CTLA4 mutant molecule of the invention, with immunosuppressive agents. Immunosuppressive agents include soluble gp39 (also known as CD40 ligand (CD40L), CD154, T-BAM, TRAP), soluble CD29, soluble CD40, soluble CD80 (e.g., ATCC 68627), soluble CD86, soluble CD28 (e.g., 68628), soluble CD56, soluble Thy-1, soluble CD3, soluble TCR, soluble VLA-4, soluble VCAM-1, soluble LECAM-1, soluble ELAM-1, soluble CD44, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with gp39 (e.g., ATCC HB-10916, ATCC HB-12055 and ATCC HB-12056), ligands, antibodies or antibody fragments reactive with CD40 (e.g., ATCC HB-9110), ligands, antibodies or antibody fragments reactive with B7 (e.g., ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC HB-301, ATCC HB-11341, etc), ligands, antibodies or antibody fragments reactive with CD28 (e.g., ATCC HB-11944 or mAb 9.3 as described by Martin et al (J. Clin. Immun. 4(1):18-22, 1980), ligands, antibodies or antibody fragments reactive with LFA-1 (e.g., ATCC HB-9579 and ATCC TIB-213), ligands, antibodies or antibody fragments reactive with LFA-2, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with IL-2 or IL-2R, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with IL-12, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with IFN-gamma, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with CD2, antibodies ligands, antibodies or antibody fragments reactive with CD48, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with any ICAM (e.g., ICAM-1 (ATCC CRL-2252), ICAM-2 and ICAM-3), ligands, antibodies or antibody fragments reactive with CTLA4 (e.g., ATCC HB-304), ligands, antibodies or antibody fragments reactive with Thy-1, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with CD56, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with CD3, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with CD29, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with TCR, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with VLA-4, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with VCAM-1, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with LECAM-1, ligands,

antibodies or antibody fragments reactive with ELAM-1, ligands, antibodies or antibody fragments reactive with CD44. In certain embodiments, monoclonal antibodies are preferred. In other embodiments, antibody fragments are preferred. Antibody fragments include but are not limited to Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, scFv and domain antibodies (dAbs) including but not limited to those described in WO2006/030220. As persons skilled in the art will readily understand, the combination can include the soluble CTLA4 mutant molecules of the invention and one other immunosuppressive agent, the soluble CTLA4 mutant molecules with two other immunosuppressive agents, the soluble CTLA4 molecules with three other immunosuppressive agents, etc. The determination of the optimal combination and dosages can be determined and optimized using methods well known in the art.

[00121] A particularly useful combination is L104EA29YIg or pharmaceutical composition thereof with a compound that interferes with IL-2 and its ligand, specifically an antagonist targeted against IL-2R (alpha) which is selectively expressed on the surface of activated T-lymphocytes. A compound that binds to IL-2R(alpha) competitively inhibits IL-2 mediated activation of lymphocytes, which is a critical pathway in the cellular immune response involved in allograft rejection.

[00122] Some specific combinations include the following: L104EA29YIg and CD80 monoclonal antibodies (mAbs); L104EA29YIg and CD86 mAbs; L104EA29YIg, CD80 mAbs, and CD86 mAbs; L104EA29YIg and gp39 mAbs; L104EA29YIg and CD40 mAbs; L104EA29YIg and CD28 mAbs; L104EA29YIg, CD80 and CD86 mAbs, and gp39 mAbs; L104EA29YIg, CD80 and CD86 mAbs and CD40 mAbs; and L104EA29YIg, anti-LFA1 mAb, and anti-gp39 mAb. A specific example of a gp39 mAb is MR1. Other combinations will be readily appreciated and understood by persons skilled in the art.

[00123] In accordance with the foregoing the present invention provides in a yet further aspect methods as defined above comprising co-administration, e.g., concomitantly or in sequence, of a therapeutically effective dose of soluble CTLA4 mutant molecule of the invention, with an adjunctive agent and/or a corticosteroid. The goal is to replace the toxic calcineurin inhibitors with the CTLA4 mutant molecules of the invention. However, the CTLA4 mutant molecules of the invention also may be co-administered concomitantly or sequentially with CNIs such as

cyclosporine (Neoral®, Sandimmune® from Novartis) and tacrolimus (FK506, Prograf® from Fujisawa).

[00124] Examples of adjunctive agents include but are not limited to inhibitors of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH), e.g., mycophenolate mofetil (MMF, Cellcept® from Roche Laboratories) and mycophenolic acid (Myfortic® from Novartis); rapamycin (sirolimus, Rapamune® from Wyeth/Ayerst); azathioprine (Azarsan® from Salix, Imuran®, generic); a lymphocyte homing agent, e.g., FTY720(from Novartis); FK778(from Fujisawa); Jak-3 (from Pfizer); and Certican® (everolimus from Novartis).

[00125] Examples of corticosteroids include but are not limited to, betamethasone, budesonide, cortisol, cortisone, dexamethasone, hydrocritisone, methylprednisolone, prednisolone, prednisone and triamcinolone.

[00126] Typical co-administration combinations include but are not limited to L104EA29YIg and at least one adjunctive agent selected from the group listed above; L104EA29YIg and at least one corticosteroid selected from the group listed above; L104EA29YIg, MMF(Cellcept from Roche) and a corticosteroid selected from the group listed above; L104EA29YIg, rapamycin (sirolimus, Rapamune® from Wyeth/Ayerst) with or without a corticosteroid selected from the group listed above.

[00127] The co-administration combinations described above may be utilized with an induction agent such as immunosuppressive monoclonal antibodies, e.g., basiliximab (Simulect® from Novartis), muromonab (Orthoclone OKT3® from Ortho Biotech), rituximab (Rituxan® from Genentech) and daclizumab (Zenapax® from Roche Labs); or anti-thymocyte globulin (Thymoglobulin® from SangStat). For example, suitable combinations include but are not limited to basiliximab (Simulect® from Novartis) with L104EA29YIg, MMF(Cellcept from Roche) and prednisolone; or daclizumab (Zenapax® from Roche), L104EA29YIg and rapamycin (sirolimus, Rapamune® from Wyeth/Ayerst).

[00128] Typically, the standard dosages and administration regimen of the co-administered drugs described above are not influenced by the addition of the CTLA4 mutant molecules of the invention to the treatment regimen. However, one knowledgeable in the art may prescribe lower doses of the co-administered drugs, e.g.,

adjunctive agents and/or corticosteroids, due to the incorporation of the less toxic CTLA4 mutant molecules of the invention into the treatment regimen.

[00129] Prescribing information may be based on the package insert for each co-administered drug. A corticosteroid may be co-administered with the molecules or pharmaceutical composition of the invention. For example, subjects may be treated daily with corticosteroids. One steroid maintenance and taper strategy may include 500 mg i.v. methylprednisolone on arrival in the operating room (OR) 250 mg i.v. methylprednisolone on day 2, followed by prednisone (or prednisolone) 100 mg orally on day 3, followed by a taper of prednisone (or prednisolone) to 20 - 30 mg/day by the end of week 2, followed by a taper of prednisone (or prednisolone) to no lower than 2.5 mg/day through month 6. Subjects may remain on at least 2.5 mg /day throughout the course of their treatment.

[00130] Additional co-administered drugs may include mycophenolate mofetil (MMF). Typically MMF is administered in 2 divided doses on a consistent schedule in relation to time of day and meals. An example of an administration regimen for MMF includes 2 g daily. The first dose can be administered preoperatively. Subsequent doses may be administered p.o. as soon as the subject is able to tolerate medications by mouth. The dose and schedule may be adjusted on the basis of laboratory values (e.g., decreased WBCs) and subject tolerability. The package insert provides full prescribing information.

[00131] Another co-administered drug may include basiliximab. Reconstituted basiliximab (20 mg in 5 mL) may be diluted to a volume of 50 mL with normal saline or dextrose 5% and administered as an i.v. infusion over 20-30 minutes. The first 20 mg dose may be administered on Day 1 (the day of transplantation). The second 20 mg dose may be given on Day 5. The package insert provides full prescribing information

[00132] Further provided are therapeutic combinations, e.g., a kit, e.g., for use in any method as defined above, comprising a L104EA29YIg, in free form or in pharmaceutically acceptable salt form, to be used concomitantly or in sequence with at least one pharmaceutical composition comprising an adjunctive agent and corticosteroids. The kit may comprise instructions for its administration.

[00133] The label and/or the instructions may indicate that the pharmaceutical composition can be used alone, or in combination, concomitantly or sequentially with a second agent to treat a condition of choice e.g., immune system diseases, autoimmune diseases, immunoproliferative diseases, immune disorders associated with graft transplantation as described above.

[00134] The label may indicate appropriate dosages for the molecules disclosed herein. For example, the label can indicate that dosages for a molecule that is effective for blocking B7 interactions with its ligand and/or treating an immune system disease may be based on body weight, and administration regimens may be dictated by the target serum trough profiles. For example, the label may indicate that the effective target trough serum concentrations of CTLA4 mutant molecules disclosed herein to treat an immune system disease may be between about 0.2μg/mL and about 30μg/mL. Alternatively, the label may indicate that the CTLA4 mutant molecules disclosed herein may be administered in an amount between about 0.1 to about 20.0 mg/kg weight of the patient to treat immune system diseases.

METHODS FOR PRODUCING THE MOLECULES OF THE INVENTION

[00135] Expression of CTLA4 mutant molecules can be in prokaryotic cells. Prokaryotes most frequently are represented by various strains of bacteria. The bacteria may be a gram positive or a gram negative. Typically, gram-negative bacteria such as *E. coli* are preferred. Other microbial strains may also be used.

[00136] Sequences encoding CTLA4 mutant molecules can be inserted into a vector designed for expressing foreign sequences in prokaryotic cells such as *E. coli.* These vectors can include commonly used prokaryotic control sequences which are defined herein to include promoters for transcription initiation, optionally with an operator, along with ribosome binding site sequences, include such commonly used promoters as the beta-lactamase (penicillinase) and lactose (lac) promoter systems (Chang, et al., (1977) *Nature* 198:1056), the tryptophan (trp) promoter system (Goeddel, et al., (1980) *Nucleic Acids Res.* 8:4057) and the lambda derived P_L promoter and N-gene ribosome binding site (Shimatake, et al., (1981) *Nature* 292:128).

[00137] Such expression vectors will also include origins of replication and selectable markers, such as a beta-lactamase or neomycin phosphotransferase gene conferring resistance to antibiotics, so that the vectors can replicate in bacteria and cells carrying the plasmids can be selected for when grown in the presence of antibiotics, such as ampicillin or kanamycin.

[00138] The expression plasmid can be introduced into prokaryotic cells via a variety of standard methods, including but not limited to $CaCl_2$-shock (Cohen, (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2110, and Sambrook et al. (eds.), "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, (1989)) and electroporation.

[00139] In accordance with the practice of the invention, eukaryotic cells are also suitable host cells. Examples of eukaryotic cells include any animal cell, whether primary or immortalized, yeast (e.g., *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, and *Pichia pastoris*), and plant cells. Myeloma, COS and CHO cells are examples of animal cells that may be used as hosts. Particular CHO cells include, but are not limited to, DG44 (Chasin, et la., 1986 *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555-556; Kolkekar 1997 *Biochemistry* 36:10901-10909), CHO-K1 (ATCC No. CCL-61), CHO-K1 Tet-On cell line (Clontech), CHO designated ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), CHO clone 13 (GEIMG, Genova, IT), CHO clone B (GEIMG, Genova, IT), CHO-K1/SF designated ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), and RR-CHOK1 designated ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK). Exemplary plant cells include tobacco (whole plants, cell culture, or callus), corn, soybean, and rice cells. Corn, soybean, and rice seeds are also acceptable.

[00140] Nucleic acid sequences encoding the CTLA4 mutant molecules can also be inserted into a vector designed for expressing foreign sequences in a eukaryotic host. The regulatory elements of the vector can vary according to the particular eukaryotic host.

[00141] Commonly used eukaryotic control sequences for use in expression vectors include promoters and control sequences compatible with mammalian cells such as, for example, CMV promoter (CDM8 vector) and avian sarcoma virus (ASV) (πLN vector). Other commonly used promoters include the early and late promoters from

Simian Virus 40 (SV40) (Fiers, et al., (1973) *Nature* 273:113), or other viral promoters such as those derived from polyoma, Adenovirus 2, and bovine papilloma virus. An inducible promoter, such as hMTII (Karin, et al., (1982) *Nature* 299:797-802) may also be used.

[00142] Vectors for expressing CTLA4 mutant molecules in eukaryotes may also carry sequences called enhancer regions. These are important in optimizing gene expression and are found either upstream or downstream of the promoter region.

[00143] Examples of expression vectors for eukaryotic host cells include, but are not limited to, vectors for mammalian host cells (e.g., BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2 (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); pVPakc Vectors, pCMV vectors, pSG5 vectors (Stratagene)), retroviral vectors (e.g., pFB vectors (Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) or modified forms thereof,adenoviral vectors; Adeno-associated virus vectors, baculovirus vectors, yeast vectors (e.g., pESC vectors (Stratagene)).

[00144] Nucleic acid sequences encoding CTLA4 mutant molecules can integrate into the genome of the eukaryotic host cell and replicate as the host genome replicates. Alternatively, the vector carrying CTLA4 mutant molecules can contain origins of replication allowing for extrachromosomal replication.

[00145] For expressing the nucleic acid sequences in *Saccharomyces cerevisiae*, the origin of replication from the endogenous yeast plasmid, the 2μ circle can be used. (Broach, (1983) *Meth. Enz.* 101:307). Alternatively, sequences from the yeast genome capable of promoting autonomous replication can be used (see, for example, Stinchcomb et al., (1979) *Nature* 282:39); Tschemper et al., (1980) *Gene* 10:157; and Clarke et al., (1983) *Meth. Enz.* 101:300).

[00146] Transcriptional control sequences for yeast vectors include promoters for the synthesis of glycolytic enzymes (Hess et al., (1968) *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149; Holland et al., (1978) *Biochemistry* 17:4900). Additional promoters known in the art include the CMV promoter provided in the CDM8 vector (Toyama and Okayama, (1990) *FEBS* 268:217-221); the promoter for 3-phosphoglycerate kinase (Hitzeman et al., (1980) *J. Biol. Chem.* 255:2073), and those for other glycolytic enzymes.

[00147] Other promoters are inducible because they can be regulated by environmental stimuli or the growth medium of the cells. These inducible promoters

include those from the genes for heat shock proteins, alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, enzymes associated with nitrogen catabolism, and enzymes responsible for maltose and galactose utilization.

[00148] Regulatory sequences may also be placed at the 3' end of the coding sequences. These sequences may act to stabilize messenger RNA. Such terminators are found in the 3' untranslated region following the coding sequences in several yeast-derived and mammalian genes.

[00149] Exemplary vectors for plants and plant cells include, but are not limited to, Agrobacterium T_i plasmids, cauliflower mosaic virus (CaMV), and tomato golden mosaic virus (TGMV).

[00150] General aspects of mammalian cell host system transformations have been described by Axel (U.S. Patent No. 4,399,216 issued Aug. 16, 1983). Mammalian cells can be transformed by methods including but not limited to, transfection in the presence of calcium phosphate, microinjection, electroporation, or via transduction with viral vectors.

[00151] Methods for introducing foreign DNA sequences into plant and yeast genomes include (1) mechanical methods, such as microinjection of DNA into single cells or protoplasts, vortexing cells with glass beads in the presence of DNA, or shooting DNA-coated tungsten or gold spheres into cells or protoplasts; (2) introducing DNA by making cell membranes permeable to macromolecules through polyethylene glycol treatment or subjection to high voltage electrical pulses (electroporation); or (3) the use of liposomes (containing cDNA) which fuse to cell membranes.

[00152] Expression of CTLA4 mutant molecules can be detected by methods known in the art. For example, the mutant molecules can be detected by Coomassie staining SDS-PAGE gels and immunoblotting using antibodies that bind CTLA4. Protein recovery can be performed using standard protein purification means, e.g., affinity chromatography or ion-exchange chromatography, to yield substantially pure product (R. Scopes in: "*Protein Purification, Principles and Practice*", Third Edition, Springer-Verlag (1994)).

[00153] US patent application US Publication Number 2005/0019859, 2005/0084933 and WO 04/058944 teach a processes for the production of proteins of

the invention, specifically recombinant glycoprotein products, by animal or mammalian cell cultures and are herein incorporated by reference.

[00154] The invention further provides soluble CTLA4 mutant molecules produced above herein.

CTLA4IG CODON-BASED MUTAGENESIS

[00155] In one embodiment, site-directed mutagenesis and a novel screening procedure were used to identify several mutations in the extracellular domain of CTLA4 that improve binding avidity for CD86. In this embodiment, mutations were carried out in residues in the regions of the extracellular domain of CTLA4 from serine 25 to arginine 33, the C' strand (alanine 49 and threonine 51), the F strand (lysine 93, glutamic acid 95 and leucine 96), and in the region from methionine 97 through tyrosine 102, tyrosine 103 through glycine 107 and in the G strand at positions glutamine 111, tyrosine 113 and isoleucine 115. These sites were chosen based on studies of chimeric CD28/CTLA4 fusion proteins (Peach et al., *J. Exp. Med.*, 1994, 180:2049-2058), and on a model predicting which amino acid residue side chains would be solvent exposed, and a lack of amino acid residue identity or homology at certain positions between CD28 and CTLA4. Also, any residue which is spatially in close proximity (5 to 20 Angstrom Units) to the identified residues is considered part of the present invention.

[00156] To synthesize and screen soluble CTLA4 mutant molecules with altered affinities for CD80 and/or CD86, a two-step strategy was adopted. The experiments entailed first generating a library of mutations at a specific codon of an extracellular portion of CTLA4 and then screening these by BIAcore analysis to identify mutants with altered reactivity to CD80 or CD86. The Biacore assay system (Pharmacia, Piscataway, N.J.) uses a surface plasmon resonance detector system that essentially involves covalent binding of either CD80Ig or CD86Ig to a dextran-coated sensor chip which is located in a detector. The test molecule can then be injected into the chamber containing the sensor chip and the amount of complementary protein that binds can be assessed based on the change in molecular mass which is physically associated with the dextran-coated side of the sensor chip; the change in molecular mass can be measured by the detector system.

ADVANTAGES OF THE INVENTION

[00157] Because CTLA4 binding to CD80 and CD86 is characterized by rapid "on" rates and rapid dissociation ("off") rates, and because CTLA4Ig-CD86 complexes dissociate approximately 5- to 8-fold more rapidly than CTLA4Ig-CD80 complexes, it was reasoned that slowing the rate of dissociation of CTLA4Ig from CD80 and/or CD86 would result in molecules with more potent immunosuppressive properties. Thus, soluble CTLA4 mutant molecules having a higher avidity for CD80- or CD86- positive cells compared to wild type CTLA4, or non-mutated forms of CTLA4Ig, are expected to block the priming of antigen specific activated cells with higher efficiency than wild type CTLA4 or non-mutated forms of CTLA4Ig.

EXAMPLES

[00158] The following examples are presented to illustrate the present invention and to assist one of ordinary skill in making and using the same. The examples are not intended in any way to otherwise limit the scope of the invention.

EXAMPLE 1

[00159] This example provides a description of the methods used to generate the nucleotide sequences encoding the soluble CTLA4 mutant molecules of the invention. A single-site mutant L104EIg was generated and tested for binding kinetics for CD80 and/or CD86. The L104EIg nucleotide sequence was used as a template to generate the double-site mutant CTLA4 sequence, L104EA29YIg, which was tested for binding kinetics for CD80 and/or CD86.

CTLA4Ig Codon Based Mutagenesis

[00160] A mutagenesis and screening strategy was developed to identify mutant CTLA4Ig molecules that had slower rates of dissociation ("off" rates) from CD80 and/or CD86 molecules. Single-site mutant nucleotide sequences were generated using CTLA4Ig (U.S. Patent Nos: 5,844,095; 5,851,795; and 5,885,796; ATCC Accession No. 68629) as a template. Mutagenic oligonucleotide PCR primers were designed for random mutagenesis of a specific cDNA codon by allowing any base at

positions 1 and 2 of the codon, but only guanine or thymine at position 3 (XXG/T; also known as NNG/T). In this manner, a specific codon encoding an amino acid could be randomly mutated to code for each of the 20 amino acids. In that regard, XXG/T mutagenesis yields 32 potential codons encoding each of the 20 amino acids. PCR products encoding mutations in close proximity to -M97-G107 of CTLA4Ig (see Figure 7, SEQ ID NOS: 3 and 4; or figure 8, SEQ ID NOS: 5 and 6), were digested with SacI/XbaI and subcloned into similarly cut CTLA4Ig πLN (also known as piLN) expression vector. This method was used to generate the single-site CTLA4 mutant molecule L104EIg (Figure 8, SEQ ID NOS: 5 and 6).

[00161] For mutagenesis in proximity to S25-R33 of CTLA4Ig, a silent NheI restriction site was first introduced 5' to this loop, by PCR primer-directed mutagenesis. PCR products were digested with NheI/XbaI and subcloned into similarly cut CTLA4Ig or L104EIg expression vectors. This method was used to generate the double-site CTLA4 mutant molecule L104EA29YIg (Figure 7, SEQ ID NOS: 3 and 4). In particular, the nucleic acid molecule encoding the single-site CTLA4 mutant molecule, L104EIg, was used as a template to generate the double-site CTLA4 mutant molecule, L104EA29YIg. The piLN vector having the L104EA29YIg is shown in Figure 12.

EXAMPLE 2

[00162] The following provides a description of the screening methods used to identify the single- and double-site mutant CTLA4 polypeptides, expressed from the constructs described in Example 1, that exhibited a higher binding avidity for CD80 and CD86 antigens, compared to non-mutated CTLA4Ig molecules.

[00163] Current *in vitro* and *in vivo* studies indicate that CTLA4Ig by itself is unable to completely block the priming of antigen specific activated T cells. *In vitro* studies with CTLA4Ig and either monoclonal antibody specific for CD80 or CD86 measuring inhibition of T cell proliferation indicate that anti-CD80 monoclonal antibody did not augment CTLA4Ig inhibition. However, anti-CD86 monoclonal antibody did augment the inhibition, indicating that CTLA4Ig was not as effective at blocking CD86 interactions. These data support earlier findings by Linsley et al. (*Immunity*, (1994), 1:793-801) showing inhibition of CD80-mediated cellular

responses required approximately 100 fold lower CTLA4Ig concentrations than for CD86-mediated responses. Based on these findings, it was surmised that soluble CTLA4 mutant molecules having a higher avidity for CD86 than wild type CTLA4 should be better able to block the priming of antigen specific activated cells than CTLA4Ig.

[00164] To this end, the soluble CTLA4 mutant molecules described in Example 1 above were screened using a novel screening procedure to identify several mutations in the extracellular domain of CTLA4 that improve binding avidity for CD80 and CD86. This screening strategy provided an effective method to directly identify mutants with apparently slower "off" rates without the need for protein purification or quantitation since "off" rate determination is concentration independent (O'Shannessy et al., (1993) *Anal. Biochem.*, 212:457-468).

[00165] COS cells were transfected with individual miniprep purified plasmid DNA and propagated for several days. Three day conditioned culture media was applied to BIAcore biosensor chips (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) coated with soluble CD80Ig or CD86Ig. The specific binding and dissociation of mutant proteins was measured by surface plasmon resonance (O'Shannessy, D. J., et al., (1993) *Anal. Biochem.* 212:457-468). All experiments were run on BIAcore™ or BIAcore™ 2000 biosensors at 25°C. Ligands were immobilized on research grade NCM5 sensor chips (Pharmacia) using standard N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimidN-hydroxysuccinimide coupling (Johnsson, B., et al. (1991) *Anal. Biochem.* 198: 268-277; Khilko, S.N., et al.(1993) *J. Biol. Chem.* 268:5425-15434).

Screening Method

[00166] COS cells grown in 24 well tissue culture plates were transiently transfected with DNA encoding mutant CTLA4Ig. Culture media containing secreted soluble mutant CTLA4Ig was collected 3 days later.

[00167] Conditioned COS cell culture media was allowed to flow over BIAcore biosensor chips derivatized with CD86Ig or CD80Ig (as described in Greene et al., 1996 *J. Biol. Chem.* 271:26762-26771), and mutant molecules were identified with "off" rates slower than that observed for wild type CTLA4Ig. The cDNAs corresponding to selected media samples were sequenced and DNA was prepared to

perform larger scale COS cell transient transfection, from which mutant CTLA4Ig protein was prepared following protein A purification of culture media.

[00168] BIAcore analysis conditions and equilibrium binding data analysis were performed as described in J. Greene et al. 1996 J. Biol. Chem. 271:26762-26771, and as described herein.

BIAcore Data Analysis

[00169] Senosorgram baselines were normalized to zero response units (RU) prior to analysis. Samples were run over mock-derivatized flow cells to determine background response unit (RU) values due to bulk refractive index differences between solutions. Equilibrium dissociation constants (K_d) were calculated from plots of R_{eq} versus C, where R_{eq} is the steady-state response minus the response on a mock-derivatized chip, and C is the molar concentration of analyte. Binding curves were analyzed using commercial nonlinear curve-fitting software (Prism, GraphPAD Software).

[00170] Experimental data were first fit to a model for a single ligand binding to a single receptor (1-site model, i.e., a simple langmuir system, A+B↔AB), and equilibrium association constants (K_d=[A]•[B]\[AB]) were calculated from the equation $R=R_{max}•C/(K_d+C)$. Subsequently, data were fit to the simplest two-site model of ligand binding (i.e., to a receptor having two non-interacting independent binding sites as described by the equation $R=R_{max1}•C\(K_{d1}+C)+R_{max2}•C\(K_{d2}+C)$).

[00171] The goodness-of-fits of these two models were analyzed visually by comparison with experimental data and statistically by an F test of the sums-of-squares. The simpler one-site model was chosen as the best fit, unless the two-site model fit significantly better ($p<0.1$).

[00172] Association and disassociation analyses were performed using BIA evaluation 2.1 Software (Pharmacia). Association rate constants k_{on} were calculated in two ways, assuming both homogenous single-site interactions and parallel two-site interactions. For single-site interactions, k_{on} values were calculated according to the equation $R_t=R_{eq}(1-exp^{-ks(t-t_0)})$, where R_t is a response at a given time, t; R_{eq} is the steady-state response; t_0 is the time at the start of the injection; and $k_s=dR/dt=k_{on}•Ck_{off}$, and where C is a concentration of analyte, calculated in terms of

monomeric binding sites. For two-site interactions k_{on} values were calculated according to the equation $R_t=R_{eq1}(1-exp^{-ks1(t-t_0)})+R_{eq2}(1-exp^{ks2(t-t_0)})$. For each model, the values of k_{on} were determined from the calculated slope (to about 70% maximal association) of plots of k_s versus C.

[00173] Dissociation data were analyzed according to one site (AB=A+B) or two sites (AiBj=Ai+Bj) models, and rate constants (k_{off}) were calculated from best fit curves. The binding site model was used except when the residuals were greater than machine background (2-10 RU, according to machine), in which case the two-binding site model was employed. Half-times of receptor occupancy were calculated using the relationship $t_{1/2}=0.693/k_{off}$.

Flow Cytometry

[00174] Murine mAb L307.4 (anti-CD80) was purchased from Becton Dickinson (San Jose, California) and IT2.2 (anti-B7-0 [also known as CD86]), from Pharmingen (San Diego, California). For immunostaining, CD80-positive and/or CD86-positive CHO cells were removed from their culture vessels by incubation in phosphate-buffered saline (PBS) containing 10mM EDTA. CHO cells (1-10 x 10^5) were first incubated with mAbs or immunoglobulin fusion proteins in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS), then washed and incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse or anti-human immunoglobulin second step reagents (Tago, Burlingame, California). Cells were given a final wash and analyzed on a FACScan (Becton Dickinson).

SDS-PAGE and Size Exclusion Chromatography

[00175] SDS-PAGE was performed on Tris/glycine 4-20% acrylamide gels (Novex, San Diego, CA). Analytical gels were stained with Coomassie Blue, and images of wet gels were obtained by digital scanning. CTLA4Ig (25 μg) and L104EA29YIg (25 μg) were analyzed by size exclusion chromatography using a TSK-GEL G300 SW_{XL} column (7.8 x 300mm, Tosohaas, Montgomeryville, PA) equilibrated in phosphate buffered saline containing 0.02% NAN_3 at a flow rate of 1.0 ml/min.

CTLA4X$_{C120S}$ and L104EA29YX$_{C120S}$

[00176] Single chain CTLA4X$_{C120S}$ was prepared as previously described (Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270:15417-15424). Briefly, an oncostatin M CTLA4 (OMCTLA4) expression plasmid was used as a template, the forward primer,

GAGGTGATAAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACAG

was chosen to match sequences in the vector; and the reverse primer,

GTGGTGTATTGGTCTAGATCAATCAGAATCTGGGCACGGTTC

corresponded to the last seven amino acids (i.e. amino acids 118-124) in the extracellular domain of CTLA4, and contained a restriction enzyme site, and a stop codon (TGA). The reverse primer specified a C120S (cysteine to serine at position 120) mutation. In particular, the nucleotide sequence GCA (nucleotides 34-36) of the reverse primer shown above is replaced with one of the following nucleotide sequences: AGA, GGA, TGA, CGA, ACT, or GCT. As persons skilled in the art will understand, the nucleotide sequence GCA is a reversed complementary sequence of the codon TGC for cysteine. Similarly, the nucleotide sequences AGA, GGA, TGA, CGA, ACT, or GCT are the reversed complementary sequences of the codons for serine. Polymerase chain reaction products were digested with *Hind*III/*Xba*I and directionally subcloned into the expression vector πLN (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ). L104EA29YX$_{C120S}$ was prepared in an identical manner. Each construct was verified by DNA sequencing.

Identification and Biochemical Characterization of High Avidity Mutants

[00177] Twenty four amino acids were chosen for mutagenesis and the resulting ~2300 mutant proteins assayed for CD86Ig binding by surface plasmon resonance (SPR; as described, supra). The predominant effects of mutagenesis at each site are summarized in Table II. Random mutagenesis of some amino acids in the S25-R33 apparently did not alter ligand binding. Mutagenesis of E31 and R33 and residues M97-Y102 apparently resulted in reduced ligand binding. Mutagenesis of residues,

S25, A29, and T30, K93, L96, Y103, L104, and G105, resulted in proteins with slow "on" and/or slow "off" rates. These results confirm previous findings that residues in the S25-R33 region, and residues in or near M97-Y102 influence ligand binding (Peach et al., (1994) J. Exp. Med., 180:2049-2058.

[00178] Mutagenesis of sites S25, T30, K93, L96, Y103, and G105 resulted in the identification of some mutant proteins that had slower "off" rates from CD86Ig. However, in these instances, the slow "off" rate was compromised by a slow "on" rate which resulted in mutant proteins with an overall avidity for CD86Ig that was apparently similar to that seen with wild type CTLA4Ig. In addition, mutagenesis of K93 resulted in significant aggregation which may have been responsible for the kinetic changes observed.

[00179] Random mutagenesis of L104 followed by COS cell transfection and screening by SPR of culture media samples over immobilized CD86Ig yielded six media samples containing mutant proteins with approximately 2-fold slower "off" rates than wild type CTLA4Ig. When the corresponding cDNA of these mutants were sequenced, each was found to encode a leucine to glutamic acid mutation (L104E). Apparently, substitution of leucine 104 to aspartic acid (L104D) did not affect CD86Ig binding.

[00180] Mutagenesis was then repeated at each site listed in Table II, this time using L104E as the PCR template instead of wild type CTLA4Ig, as described above. SPR analysis, again using immobilized CD86Ig, identified six culture media samples from mutagenesis of alanine 29 with proteins having approximately 4-fold slower "off" rates than wild type CTLA4Ig. The two slowest were tyrosine substitutions (L104EA29Y), two were leucine (L104EA29L), one was tryptophan (L104EA29W), and one was threonine (L104EA29T). Apparently, no slow "off" rate mutants were identified when alanine 29 was randomly mutated, alone, in wild type CTLA4Ig.

[00181] The relative molecular mass and state of aggregation of purified L104E and L104EA29YIg was assessed by SDS-PAGE and size exclusion chromatography. L104EA29YIg (~1 μg; lane 3) and L104EIg (~1 μg; lane 2) apparently had the same electrophoretic mobility as CTLA4Ig (~1 μg; lane 1) under reducing (~50kDa; +ßME; plus 2-mercaptoethanol) and non-reducing (~100kDa; -ßME) conditions (FIG. 10A).

Size exclusion chromatography demonstrated that L104EA29YIg (FIG. 10C) apparently had the same mobility as dimeric CTLA4Ig (FIG. 10B). The major peaks represent protein dimer while the faster eluting minor peak in FIG. 10B represents higher molecular weight aggregates. Approximately 5.0% of CTLA4Ig was present as higher molecular weight aggregates but there was no evidence of aggregation of L104EA29YIg or L104EIg. Therefore, the stronger binding to CD86Ig seen with L104EIg and L104EA29YIg could not be attributed to aggregation induced by mutagenesis.

Equilibrium and Kinetic Binding Analysis

[00182] Equilibrium and kinetic binding analysis was performed on protein A purified CTLA4Ig, L104EIg, and L104EA29YIg using surface plasmon resonance (SPR). The results are shown in Table I.

TABLE I

Equilibrium and Apparent Kinetic Constants

Immobilized Protein	Analyte	k_{on} (x 10^5) M^{-1} S^{-1}	k_{off} (x 10^{-3}) S^{-1}	K_d nM
CD80Ig	CTLA4Ig	3.44 ± 0.29	2.21 ± 0.18	6.51 ± 1.08
CD80Ig	L104EIg	3.02 ± 0.05	1.35 ± 0.08	4.47 ± 0.36
CD80Ig	L104EA29YIg	2.96 ± 0.20	1.08 ± 0.05	3.66 ± 0.41
CD80Ig	CTLA4X_{C120S}	12.0 ± 1.0	230 ±10	195 ± 25
CD80Ig	L104EA29YX_{C120S}	8.3 ± 0.26	71 ± 5	85.0 ± 2.5
CD86Ig	CTLA4Ig	5.95 ± 0.57	8.16 ± 0.52	13.9 ± 2.27
CD86Ig	L104EIg	7.03 ± 0.22	4.26 ± 0.11	6.06 ± 0.05
CD86Ig	L104EA29YIg	6.42 ± 0.40	2.06 ± 0.03	3.21 ± 0.23
CD86Ig	CTLA4X_{C120S}	16.5 ± 0.5	840 ± 55	511 ± 17
CD86Ig	L104EA29YX_{C120S}	11.4 ± 1.6	300 ± 10	267 ± 29

(values are means ± standard deviation from three different experiments)

[00183] Observed equilibrium dissociation constants (K_d; Table I) were calculated from binding curves generated over a range of concentrations (5.0-200 nM). L104EA29YIg binds more strongly to CD86Ig than does L104EIg or CTLA4Ig. The lower K_d of L104EA29YIg (3.21 nM) than L104EIg (6.06 nM) or CTLA4Ig (13.9 nM) indicates higher binding avidity of L104EA29YIg to CD86Ig. The lower K_d of

L104EA29YIg (3.66 nM) than L104EIg (4.47 nM) or CTLA4Ig (6.51 nM) indicates higher binding avidity of L104EA29YIg to CD80Ig.

[00184] Kinetic binding analysis revealed that the comparative "on" rates for CTLA4Ig, L104EIg, and L104EA29YIg binding to CD80 were similar, as were the "on" rates for CD86Ig (Table I). However, "off" rates for these molecules were not equivalent (Table I). Compared to CTLA4Ig, L104EA29YIg had approximately 2-fold slower "off" rate from CD80Ig, and approximately 4-fold slower "off" rate from CD86Ig. L104E had "off" rates intermediate between L104EA29YIg and CTLA4Ig. Since the introduction of these mutations did not significantly affect "on" rates, the increase in avidity for CD80Ig and CD86Ig observed with L104EA29YIg was likely primarily due to a decrease in "off" rates.

[00185] To determine whether the increase in avidity of L104EA29YIg for CD86Ig and CD80Ig was due to the mutations affecting the way each monomer associated as a dimer, or whether there were avidity enhancing structural changes introduced into each monomer, single chain constructs of CTLA4 and L104EA29Y extracellular domains were prepared following mutagenesis of cysteine 120 to serine as described supra, and by Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270:15417-15424. The purified proteins CTLA4X_{C120S} and L104EA29YX_{C120S} were shown to be monomeric by gel permeation chromatography (Linsley et al., (1995), supra), before their ligand binding properties were analyzed by SPR. Results showed that binding affinity of both monomeric proteins for CD86Ig was approximately 35-80-fold less than that seen for their respective dimers (Table I). This supports previously published data establishing that dimerization of CTLA4 was required for high avidity ligand binding (Greene et al., (1996) J. Biol. Chem., 271:26762-26771).

[00186] L104EA29YX_{C120S} bound with approximately 2-fold higher affinity than CTLA4X_{C120S} to both CD80Ig and CD86Ig. The increased affinity was due to approximately 3-fold slower rate of dissociation from both ligands. Therefore, stronger ligand binding by L104EA29Y was most likely due to avidity enhancing structural changes that had been introduced into each monomeric chain rather than alterations in which the molecule dimerized.

Location and Structural Analysis of Avidity Enhancing Mutations

[00187] The solution structure of the extracellular IgV-like domain of CTLA4 has recently been determined by NMR spectroscopy (Metzler et al., (1997) Nature Struct. Biol., 4:527-531. This allowed accurate location of leucine 104 and alanine 29 in the three dimensional fold (FIG. 11A-B). Leucine 104 is situated near the highly conserved MYPPPY amino acid sequence. Alanine 29 is situated near the C-terminal end of the S25-R33 region, which is spatially adjacent to the MYPPPY region. While there is significant interaction between residues at the base of these two regions, there is apparently no direct interaction between L104 and A29 although they both comprise part of a contiguous hydrophobic core in the protein. The structural consequences of the two avidity enhancing mutants were assessed by modeling. The A29Y mutation can be easily accommodated in the cleft between the S25-R33 region and the MYPPPY region, and may serve to stabilize the conformation of the MYPPPY region. In wild type CTLA4, L104 forms extensive hydrophobic interactions with L96 and V94 near the MYPPPY region. It is highly unlikely that the glutamic acid mutation adopts a conformation similar to that of L104 for two reasons. First, there is insufficient space to accommodate the longer glutamic acid side chain in the structure without significant perturbation to the S25-R33 region. Second, the energetic costs of burying the negative charge of the glutamic acid side chain in the hydrophobic region would be large. Instead, modeling studies predict that the glutamic acid side chain flips out on to the surface where its charge can be stabilized by solvation. Such a conformational change can easily be accommodated by G105, with minimal distortion to other residues in the regions.

Binding of High Avidity Mutants to CHO Cells Expressing CD80 or CD86

[00188] FACS analysis (Fig. 2) of CTLA4Ig and mutant molecules binding to stably transfected CD80+ and CD86+CHO cells was performed as described herein. CD80-positive and CD86-positive CHO cells were incubated with increasing concentrations of CTLA4Ig, L104EA29YIg, or L104EIg, and then washed. Bound immunoglobulin fusion protein was detected using fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-human immunoglobulin.

[00189] As shown in Figure 2, CD80-positive or CD86-positive CHO cells ($1.5x10^5$) were incubated with the indicated concentrations of CTLA4Ig (closed squares), L104EA29YIg (circles), or L104EIg (triangles) for 2 hr. at 23°C, washed, and incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-human immunoglobulin antibody. Binding on a total of 5,000 viable cells was analyzed (single determination) on a FACScan, and mean fluorescence intensity (MFI) was determined from data histograms using PC-LYSYS. Data were corrected for background fluorescence measured on cells incubated with second step reagent only (MFI = 7). Control L6 mAb (80 μg/ml) gave MFI < 30. These results are representative of four independent experiments.

[00190] Binding of L104EA29YIg, L104EIg, and CTLA4Ig to human CD80-transfected CHO cells is approximately equivalent (FIG. 2A). L104EA29YIg and L104EIg bind more strongly to CHO cells stably transfected with human CD86 than does CTLA4Ig (FIG. 2B).

Functional Assays

[00191] Human CD4-positive T cells were isolated by immunomagnetic negative selection (Linsley et al., (1992) J. Exp. Med. 176:1595-1604). Isolated CD4-positive T cells were stimulated with phorbal myristate acetate (PMA) plus CD80-positive or CD86-positive CHO cells in the presence of titrating concentrations of inhibitor. CD4-positive T cells (8-10 x 10^4/well) were cultured in the presence of 1 nM PMA with or without irradiated CHO cell stimulators. Proliferative responses were measured by the addition of 1 μCi/well of [3H]thymidine during the final 7 hours of a 72 hour culture. Inhibition of PMA plus CD80-positive CHO, or CD86-positive CHO, stimulated T cells by L104EA29YIg and CTLA4Ig was performed. The results are shown in FIG. 3. L104EA29YIg inhibits proliferation of CD80-positive PMA treated CHO cells more than CTLA4Ig (FIG. 3A). L104EA29YIg is also more effective than CTLA4Ig at inhibiting proliferation of CD86-positive PMA treated CHO cells (FIG. 3B). Therefore, L104EA29YIg is a more potent inhibitor of both CD80- and CD86-mediated costimulation of T cells.

[00192] Figure 4 shows inhibition by L104EA29YIg and CTLA4Ig of allostimulated human T cells prepared above, and further allostimulated with a human

B lymphoblastoid cell line (LCL) called PM that expressed CD80 and CD86 (T cells at $3.0x10^4$/well and PM at $8.0x10^3$/well). Primary allostimulation occurred for 6 days, then the cells were pulsed with ^3H-thymidine for 7 hours, before incorporation of radiolabel was determined.

[00193] Secondary allostimulation was performed as follows. Seven day primary allostimulated T cells were harvested over lymphocyte separation medium (LSM) (ICN, Aurora, OH) and rested for 24 hours. T cells were then restimulated (secondary), in the presence of titrating amounts of CTLA4Ig or L104EA29YIg, by adding PM in the same ratio as above. Stimulation occurred for 3 days, then the cells were pulsed with radiolabel and harvested as above. The effect of L104EA29YIg on primary allostimulated T cells is shown in FIG. 4A. The effect of L104EA29YIg on secondary allostimulated T cells is shown in FIG. 4B. L104EA29YIg inhibits both primary and secondary T cell proliferative responses better than CTLA4Ig.

[00194] To measure cytokine production (Figure 5), duplicate secondary allostimulation plates were set up. After 3 days, culture media was assayed using ELISA kits (Biosource, Camarillo, CA) using conditions recommended by the manufacturer. L104EA29YIg was found to be more potent than CTLA4Ig at blocking T cell IL-2, IL-4, and γ-IFN cytokine production following a secondary allogeneic stimulus (FIGS. 5A-C).

[00195] The effects of L104EA29YIg and CTLA4Ig on monkey mixed lymphocyte response (MLR) are shown in Figure 6. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC'S; $3.5x10^4$ cells/well from each monkey) from 2 monkeys were purified over lymphocyte separation medium (LSM) and mixed with 2μg/ml phytohemaglutinin (PHA). The cells were stimulated 3 days then pulsed with radiolabel 16 hours before harvesting. L104EA29YIg inhibited monkey T cell proliferation better than CTLA4Ig.

TABLE II

The effect on CD86Ig binding by mutagenesis of CTLA4Ig at the sites listed

		Effects of Mutagenesis	
Mutagenesis Site	No Apparent Effect	Slow "on" rate/slow "off rate	Reduced ligand binding
S25		+	
P26	+		
G27	+		
K28	+		
A29		+	
T30		+	
E31			+
R33			+
K93		+	
L96		+	
M97			+
Y98			+
P99			+
P100			+
P101			+
Y102			+
Y103		+	
L104		+	
G105		+	
I106	+		
G107	+		
Q111	+		
Y113	+		
I115	+		

(The predominant effect is indicated with a "+" sign)

EXAMPLE 3

[00196] This study compared the efficacy and safety of L104EA29YIg, described above, as a maintenance immunosuppressant with CsA over 12 months when used as part of a CNI-free combination regimen consisting of basiliximab(Simulect®; Novartis) induction, mycophenolate mofetil (MMF; CellCept®; Roche), and corticosteroids in renal transplant recipients.

[00197] Adult recipients of a non-HLA-identical renal allograft from a living or deceased donor were eligible. Subjects with a prior renal transplant, a history of

panel-reactive antibodies of >20%, or those deemed by the investigator to be at higher risk of acute rejection were restricted to ≤10% of the study population. Exclusion criteria included underlying renal disease of focal and segmental glomerulosclerosis, Type I or II membranoproliferative glomerulonephritis, or hemolytic uremic syndrome/thrombotic thrombocytopenic purpura; active hepatitis B or C, or HIV; and donor age >60 or <6, donors with cardiac death, or donor kidney cold ischemia time of >36 hours.

[00198] This was an open-label, randomized, active-controlled, multiple-dose, multicenter study performed in the United States, Europe and Canada. Eligible patients of either sex aged ≥18 years undergoing a renal transplant (deceased or living donor, except when donor and recipient were HLA-identical) were randomized to treatment in a 1:1:1 ratio with an L104EA29YIg more-intensive (MI) treatment regimen, L104EA29YIg less-intensive (LI) treatment regimen, or Cyclosporine A (CsA); all in combination with induction therapy with basiliximab (Simulect®; Novartis), adjunctive maintenance therapy with mycophenolate mofetil (MMF; CellCept®; Roche), and corticosteroids.. Both L104EA29YIg regimens included an early phase, in which L104EA29YIg was administered at 10 mg/kg, and a maintenance phase, in which L104EA29YIg was administered at 5 mg/kg at q4 week or q8 week intervals. Doses for each regimen were based on body weight. These doses were dictated by the target trough profiles shown to be effective during non-human primate studies. These profiles necessitated doses that were higher initially, during the period of greatest immunologic risk (Day 0-90). The early phase was longer in the MI regimen (6 vs. 3 months) and included more frequent dosing.

[00199] L104EA29YIg more intensive (MI) treatment regimen consisted administration of 10mg/kg on days 1, 5, 15, 29, 43, 57, 71, 85, 113, 141 and 169, followed by 5mg/kg every 4 or 8 weeks. L104EA29YIg less intensive (LI) treatment regimen consisted of 10mg/kg on days 1, 15, 29, 57 and 85, followed by 5mg/kg every 4 or 8 weeks. L104EA29YIg was administered in a 30-minute intravenous infusion. Patients randomized to CsA received twice-daily doses (7 ± 3 mg/kg) to achieve the pre-specified range of target serum concentrations of 150-400 ng/ml during the first month and 150-300ng/ml during months 2-12, which is consistent

with current medical practice . All patients received MMF 2g daily and basiliximab 20 mg every 4 days. A corticosteroid tapering regimen was also given consisting of an iv bolus of methylprednisolone 500 mg on Day 1 and 250 mg on Day 2, followed by oral prednisone 100 mg on Day 3, 50 mg on Day 4, 25 mg on Days 5–30, 22.5 mg on Days 31–44, 20 mg on Days 45–58, 17.5 mg on Days 59–72, 15 mg on Day 73–86, 12.5 mg on Days 87–100, and 10 mg on Days 101–114. After Day 114, the prednisone dose could be decreased by 2.5 mg every other month but not to less than 5 mg per day.

[00200] The primary objective was to demonstrate that L104EA29YIg was not inferior to CsA in the prevention of acute rejection at 6 months. Secondary objectives included assessment of the incidence of acute rejection (biopsy-confirmed or presumed) at 6 months and 1 year; measured glomerular filtration rate (GFR) via iohexol clearance at 1, 6, and 12 months; parameters of hypertension; serum cholesterol and triglycerides; and overall safety. Other pre-specified analyses included patient death or graft loss at 1 year; the severity of acute rejection; the incidence of post-transplant diabetes mellitus [defined as any therapy required for hyperglycemia for ≥4 weeks, or a hemoglobin A1C (HbA1c) >7%, in patients not previously known to be diabetic]; calculated GFR, using the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD, Levey AS, Bosch JP, Lewis JP, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med 1999;130:461-470), Jelliffe (RW. Creatinine clearance: Bedside estimate. Ann Inter Med. 1973;79:604-605), Cockcroft-Gault (Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976;16:31-41), and Nankivell (Nankivell BJ, Gruenewald SM, Allen RD, Chapman JR. Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. Transplantation. 1995; 59(12):1683-1689) formulas; pharmacokinetics and immunogenicity. Diagnosis and treatment of acute rejection (AR) was based on the Banff 97 criteria and grade (Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int 1999;55(2):713-23.). A post-hoc analysis was conducted of the incidence of chronic allograft nephropathy (CAN).

[00201] Diagnosis and treatment of acute rejection (AR) was based on the Banff 97 criteria and grade (Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int 1999;55(2):713-23.). Intraoperative renal allograft biopsies were performed to assess baseline histology. Biopsied tissue was stained and graded according to the Banff 97 working classification of kidney transplant pathology. Biopsies were evaluated by an independent pathologist blinded to treatment to confirm all episodes of clinically-suspected AR prior to treatment for AR.

[00202] Additional endpoints included: clinically suspected and biopsy proven acute rejection (CSBPAR) at 12 months; death or graft loss at 1 year; severity of AR episodes (measured using the Banff 97 scale); treatment failure (defined as investigator opinion; ≥grade IIB rejection; recurrent or steroid-resistant rejection); renal function at 1, 6 and 12 months (glomerular filtration rates [GFRs] assessed by Iohexol clearance) and evidence of chronic allograft nephropathy (CAN) (interstitial fibrosis and tubular atrophy); parameters of hypertension (diastolic blood pressure [BP] ≥90 mm Hg and/or systolic BP ≥140 mm Hg); serum lipids; safety, tolerability and adverse events (AEs) in patients treated with L104EA29YIg compared with CsA-treated patients.

[00203] For safety and tolerability assessments, AEs, laboratory measurements (hematology, biochemistry and urine analysis) and vital signs were recorded during regular scheduled clinic visits.

Results

[00204] A total of 218 patients underwent renal transplantation and were randomized to the MI group (N=74), LI group (N=71), or CsA (N=73). Baseline demographics and clinical characteristics were similar between the three treatment groups. A total of 164 patients completed 1 year of treatment. Of the patients who discontinued prior to 1 year (N=16 vs 16 vs 20; MI regimen versus LI regimen versus CsA), the most common reasons were AEs (N=5 versus 8 vs 9) and treatment failure (N=7 versus 5 versus 3).

[00205] The incidence of CSBPAR occurred infrequently in all treatment groups, and there was no statistically significant difference in the incidence of either CSBPAR

or biopsy proven acute rejection (BPAR) between treatment groups. At 6 and 12 months, incidence of CSBPAR was 6.8%, 5.6% and 8.2% for MI, LI and CsA treatment, respectively.

[00206] Incidence of BPAR was also similar between groups at 6 and 12 months, although BPAR was slightly higher in the LI group than in the other two groups (18.9%, 29.6% and 17.8% for MI, LI and CsA treatment respectively). Biopsy-proven acute rejection was more frequent than CSBPAR in all treatment groups, and was most common in the LI group. However, many of these events were found to occur in patients with L104EA29YIg at below desired trough serum concentrations.

[00207] No statistically significant difference between treatment groups was seen in the severity of AR; however, numbers were small and did not result in graft loss.

[00208] This study was unblinded to study medication in order to permit standard of care with respect to CsA, which probably contributed to the increased number of biopsies taken in the L104EA29YIg groups (N=345) compared with the CsA group (N=144). Although this is not unexpected for a study designed in this way, it could have increased the rate of diagnosis of renal histological abnormalities in the L104EA29YIg treatment groups.

[00209] Death and/or graft loss was infrequent in all treatment groups, with 1 death reported in the MI group, 4 in the CsA group and none in the LI group. Most graft losses were not caused by immunologic events and only 3 grafts were lost in the MI and CsA groups versus 1 in the LI group.

[00210] Significant improvements in renal function were seen with L104EA29YIg -based treatment compared to CsA-based immunosuppression. Iohexol clearance was greater with L104EA29YIg treatment at all time-points, with a mean improvement of 11 ml/min/1.73m^2 (~20%) compared with CsA at 12 months.

[00211] At 12 months, chronic allograft nephropathy (CAN) was between 30 and 50% less common, in relative terms, in L104EA29YIg - than CsA-treated patients. Rates of new or worsening CAN at 12 months were 29%, 19% and 44% for MI, LI and CsA groups, respectively.

[00212] At 1 year, mean systolic blood pressure was 3–4 mmHg higher in patients treated with CsA (133 mmHg) versus patients in the MI (130 mmHg) and LI (129 mmHg) treatment groups. This was despite lower use of anti-hypertensive medication

in the L104EA29YIg groups (MI: 87.5%; LI 84.1%: CsA 92.2%). Total serum cholesterol was slightly lower with L104EA29YIg (MI: 198 mg/dL; LI: 201 mg/dL) versus CsA- (212 mg/dL) treated patients although lipid-lowering medication use was also lower with L104EA29YIg (MI: 36.1%; LI: 31.9%; CsA : 53.1%).

[00213] Four (5.5%) patients died in the CsA group compared with 1 in the L104EA29YIg treatment groups. Rates of adverse events (AEs) were comparable between treatment groups; however, related AEs were significantly lower following L104EA29YIg treatment than CsA treatment. Intravenous administration of L104EA29YIg was well tolerated with no infusion reactions. L104EA29YIg-treated patients did not exhibit typical CsA-related adverse events, such as anemia, leucopenia, hirsutism, tremor and gingival hyperplasia. L104EA29YIg-based therapy was not associated with any increased risk of infections or malignancies compared with CsA-based therapy.

Conclusion

[00214] This 12-month study demonstrates that L104EA29YIg-based maintenance therapy confers equivalent efficacy in preventing AR and similar patient and graft survival compared with CsA. In addition, L104EA29YIg demonstrated significant improvements in renal function and reductions in CAN compared with CsA-based maintenance immunosuppression. L104EA29YIg was safe and well tolerated and was not associated with typical CNI-related toxicities.

[00215] Rates of CSBPAR and BPAR were similar between the three treatment groups demonstrating that the low AR rates observed with CsA-based therapy are also achieved with L104EA29YIg. The majority of BPARs were classified as sub-clinical, suggesting that renal function was not impaired. The numerically lower rate of AR in the MI group, compared with the LI group, suggests a possible dose-dependent response with L104EA29YIg. More frequent biopsies in the L104EA29YIg groups could potentially have led to over-diagnosis of both acute and chronic rejection in these groups, suggesting that the benefits of L104EA29YIg therapy may be understated in this study.

[00216] The majority of BPAR events occurred within the first three post-transplant months, which is not unexpected since others have shown that higher doses

of immunosuppressants are required during the early post-transplantation period (Wiecek A, Nowicki M, Kokot F, Ritz E. Acute failure of the transplanted kidney--pathophysiology, diagnosis and prevention. Ann Transplant 1996;1(4):5-9 and Bennett WM. Posttransplant acute renal failure. Ren Fail 1997;19(2):225-6). Since the majority of these events occurred at below desired trough values, consideration should be given to altering the regimen in the first month of treatment, prior to reaching a steady state. The majority of the BPARs seen during the maintenance phase occurred at very low or undetectable levels of L104EA29YIg, suggesting that the incidence of AR during those periods was related to insufficient immunosuppression, which may be avoided by alterations in the dose regimen.

[00217] This study demonstrates that L104EA29YIg is associated with similar overall AE rates compared with CsA, with fewer AEs related to study drug. No real differences in the number of viral-related AEs were identified between the three treatment groups.

[00218] In the presence of low AR rates, the new goal of maintenance immunosuppression is reduction in long-term health complications, including hypertension, hyperlipidemia, drug toxicity, and the prevention of scarring. As in autoimmune diseases, a new generation of immunoselective maintenance immunosuppressive agents is emerging. Inhibition of T-cell co-stimulation via immunoselective co-stimulation blockade with L104EA29YIg represents a new paradigm, offering the promise of more selective maintenance immunosuppression, reduced toxicities and improved long-term outcomes in renal transplantation.

EXAMPLE 4

[00219] There exists substantial unmet medical need for new therapies in renal transplantation that can provide short-term subject and graft survival comparable to the CNIs without their long-term nephrotoxic, cardiovascular, and metabolic effects. The need is particularly great among recipients of ECD define renal allografts, whose long-term subject and graft survival rates are distinctly below those of recipients of allografts from donors meeting standard eligibility criteria. L104EA29YIg, an immunosuppressive agent with a novel mechanism of action, is a promising non-nephrotoxic candidate for use in renal transplant recipients of ECD allografts.

Because L104EA29YIg can be administered at the time of engraftment rather than in a delayed fashion, as is frequently necessary with CNIs – especially in those allografts with initial impaired renal function - it affords immunosuppression in a timely manner and without the need for polyclonal antilymphocyte preparations. This may translate into comparable rates of acute rejection with a favorable safety profile. As L104EA29YIg is not anticipated to be nephrotoxic, additional benefits should be seen with respect to allograft structure (ie, CAN) and function (ie, GFR). Finally, unlike CNIs, the targeted mechanism of action of L104EA29YIg should provide immunosuppression without adversely affecting the cardiovascular/metabolic profile. An overall benefit-risk assessment for the use of L104EA29YIg in this subject population is provided below.

[00220] Two dose regimens (as described in Example 3, with a minor modification to the LI regimen and using the every 4-week maintenance infusion schedule) will be studied.

Primary Objectives

1) Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the composite of subject and graft survival at 12 months.

2) Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the composite of measured GFR < 60 mL/min/1.73 m^2 at Month 12 or a decrease in measured GFR ≥10 mL/min/1.73 m^2 from Month 3 to Month 12.

Secondary Objectives

1) Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measured GFR at 12 months.

2) Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on biopsy-proven CAN by 12 months.

3) Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measured GFR at 3 months, and change from baseline (3 months) to 12 months.

4) Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the proportion of subjects with a measured GFR < 30 mL/min/1.73 m^2 at 12 months.

5) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on calculated GFR at 3, 12, 24, and 36 months, and change from baseline (3 months) to 12, 24, and 36 months.

6) Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on PTDM at 12, 24, and 36 months.

7) Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measures of hypertension at 12, 24, and 36 months, including SBP and DBP, incidence and prevalence of hypertension and controlled hypertension, and intensity of treatment regimen.

8) Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measures of dyslipidemia, at 12, 24, and 36 months, including serum total, non-HDL, low-density lipoprotein (LDL), and HDL cholesterol, and TGs, incidence and prevalence of dyslipidemia and controlled dyslipidemia, and intensity of treatment regimen.

9) Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on subject and graft survival at 24 and 36 months.

10) Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measures of acute rejection at 6 months, including the incidence and severity of acute rejection, the use of polyclonal antilymphocyte preparations for impaired renal function and anticipated DGF, the initial use of lymphocyte-depleting therapy for treatment of acute rejection, the incidence of steroid-resistant acute rejection, the incidence of complete recovery (SCr returning to baseline) following acute rejection, the incidence of subclinical rejection, and the incidence of all treated acute rejection episodes regardless of histological findings.

11) . Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on QoL.

12) Assess the overall safety of L104EA29YIg, relative to CsA.

Tertiary Objectives

1) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the slope and intercept of calculated GFR from baseline (3 months) to 12, 24, and 36 months.

2) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the proportion of subjects with a measured GFR < 45 mL/min/1.73 m^2 at 12 months.

3) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the proportion of subjects with < 75 mL/min/1.73 m^2 calculated GFR at Month 12 and subjects with a decrease in calculated GFR from Month 3 to Month 12 of at least 15 mL/min/1.73 m^2.

4) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the incidence of DGF.

5) Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measures of acute rejection at 12, 24, and 36 months, including the incidence and severity of acute rejection, the use of polyclonal antilymphocyte preparations for impaired renal function and anticipated DGF, the initial use of lymphocyte-depleting therapy for treatment of acute rejection, and the incidence of steroid-resistant acute rejection, the incidence of complete recovery (SCr returning to baseline) following acute rejection, the incidence of subclinical rejection, and the incidence of all treated acute rejection episodes regardless of histological findings.

6) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on a composite cardiovascular disease endpoint (adjudicated cardiovascular death, myocardial infarction, ischemic stroke, non-elective hospitalization for cardiovascular cause, and percutaneous coronary intervention) at 12, 24, and 36 months.

7) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on a composite cardiorenal disease endpoint (death, graft loss, non-fatal myocardial infarction, and stroke) at 12, 24, and 36 months.

8) Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the Framingham Risk Score at 12, 24, and 36 months.

9) Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on incidence of discontinuation of study drug.

10) Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on anti-donor human leukocyte antigen (HLA) antibodies.

11) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on C4d positivity in biopsy specimens.

Study Design

[00221] The duration of the study is 3 years with a subsequent 8-week follow-up period for safety evaluations. At the end of the 3-year treatment period, subjects may be eligible for a long-term extension study.

[00222] This is a randomized, partially-blinded, active-controlled, parallel-group study. All subjects will receive a kidney from a donor with extended criteria as defined below. These criteria are based in part on those issued by the United Network of Organ Sharing (UNOS); they also include other features widely used to identify potentially compromised organs, such as those from donors with cardiac death (DCD, non-heart beating) or with prolonged cold ischemia time (CIT).

[00223] Approximately 540 subjects will be randomized in a 1:1:1 ratio to treatment with either L104EA29YIg (MI regimen), L104EA29YIg (LI regimen), or CsA. All subjects will also receive induction with basiliximab and a background maintenance immunosuppressive regimen of MMF and corticosteroids. Subjects randomized to the MI regimen will receive i.v. L104EA29YIg (10 mg/kg) on Days 1 and 5, then every 2 weeks through Month 3 (Weeks 2, 4, 6, 8, 10, and 12), and then every 4 weeks through 6 months (Weeks 16, 20, and 24). After 6 months, subjects in the MI treatment group will receive the maintenance dose of L104EA29YIg 5 mg/kg administered every 4 weeks until completion of the trial at 36 months. Subjects randomized to the LI regimen will receive i.v. L104EA29YIg (10 mg/kg) on Days 1 and 5, and then every 2 weeks through Month 1 (Weeks 2 and 4), and every 4 weeks through Month 3 (Weeks 8 and 12). After 3 months, subjects in the LI treatment group will receive the maintenance dose of L104EA29YIg 5 mg/kg administered every 4 weeks until completion of the trial at 36 months.

[00224] Blinding between the LI and MI groups will be preserved with the use of placebo infusions in the LI treatment group on Weeks 6 and 10. Subjects randomized to CsA will receive doses twice daily that are designed to achieve a specified trough serum concentration range consistent with current medical practice.

[00225] The use of polyclonal antilymphocyte preparations (Thymoglobulin or ATGAM) is permitted - but not required - for subjects randomized to CsA who experience impaired renal allograft function and anticipated DGF. These agents are widely utilized in this capacity to afford immunosuppression until graft function

recovers for administration of CsA. The decision to use and dose a polyclonal antilymphocyte preparation in this clinical setting is at the investigator's discretion within the protocol guidelines. The safety and efficacy of L104EA29YIg will be assessed at 1, 2, and 3 years.

Primary Outcome Measures

[00226] Each L104EA29YIg-based regimen will be compared to the CsA-based regimen on the following primary efficacy outcome measures: (1) the composite of subject and graft survival at 12 months; (2) the composite of measured GFR < 60 mL/min/1.73 m^2 at Month 12 or a decrease in measured GFR ≥10 mL/min/1.73 m^2 from Month 3 to Month 12. The intent is to demonstrate non-inferiority for death and graft loss and superiority for renal function. The endpoint of subject and graft survival was selected since these measures are the most important clinical outcomes for allograft recipients. Although allograft loss can be prevented by effective immunosuppressive therapy, the same therapy may increase the risk of death from infection, PTLD, malignancy, nephrotoxicity, or cardiovascular disease. Thus, it is appropriate to examine the composite endpoint of subject and graft survival as a summary measure of the net benefit of immunosuppressive therapy in allograft recipients. This composite endpoint has the further advantage of being assessable in all subjects without bias due to missing data or subject misclassification.

[00227] Renal function as an endpoint was selected since the relationship between post-transplant renal function and long-term renal outcome has been repeatedly demonstrated in various settings. The association is present whether renal function is measured a few days after transplant, at the time of discharge from the hospital, or at 6 and 12 months following transplant. It has been observed in recipients of kidneys from living and cadaveric donors, in recipients of kidneys from younger and older cadaveric donors, in second transplant recipients, and in adult and pediatric recipients.

[00228] Results from multicenter studies confirm the importance of SCr for predicting long-term graft survival. The relationship between renal function and long-term prognosis is strong and reproducible, but not strictly linear. In an analysis of adult renal transplant recipients, examination of the relationship between SCr at 1 year and projected median graft half-life revealed a pronounced inflection point at SCr >

1.5 mg/dL. Similarly, examination of the relationship between change in SCr from 6 months to 1 year (Δ SCr) and projected median graft half-life revealed a pronounced inflection point at Δ SCr ≥0.3 mg/dL. Thus, both the absolute level of renal function at 1 year and the change in renal function from 6 months (or a similar stable, early post-transplant time point) to 1 year is suitable for use as outcome measures. The presence of non-linearity in the relationship of renal function to long-term outcome suggests that categorical measures of renal function would be of greater clinical relevance than dimensional ones. Threshold values of > 1.5 mg/dL at 1 year for renal function and change in SCr of ≥0.3 mg/dL from Month 6 to Year 1 appear appropriate.

[00229] In the studies referenced above, the prognostic importance of renal function was demonstrated using SCr as a marker. These studies were in general too large to use direct measures of glomerular filtration. The limitations of SCr as a marker of renal function are well known. SCr levels reflect primarily the balance between renal excretion of creatinine and endogenous generation of creatinine. The latter can be significantly affected by variations in muscle mass, infection, inflammation, and steroid use, which are all common in the transplant population. Moreover, the renal excretion of creatinine can occur by 2 routes - glomerular filtration and tubular secretion. The impact of loss of glomerular filtration on SCr is commonly masked by compensatory increases in tubular secretion, and the utility of increased SCr as a marker of renal impairment is thereby reduced. It has been estimated that 40% of subjects with reduced GFR will have normal or low SCr. Numerous formulae have been developed that seek to improve the correlation between SCr and GFR by accounting for the effect of demographic and biometric factors. The level of agreement between GFR estimated from various formulas and true GFR measured by inulin clearance was studied in 294 transplant recipients with stable renal function. The proportion of predicted GFR values differing from measured inulin clearance by at least 10 mL/min/1.73 m^2 ranged from 34% for the Jelliffe formula to 53% for the Nankivell formula. The formula proposed by Levey et al will be used to calculate GFR in this study. This formula has been shown to predict GFR more accurately in the transplant population, having the best correlation between predicted and measured value than other formulae, such as Nankivell. Given the

substantial difference between true GFR and calculated GFR, clearance of a true glomerular filtration marker will be used to assess the primary endpoint of renal function (Appendix 1). A GFR of 60 mL/min/1.73 m^2, or change in GFR of at least 10 mL/min/1.73 m^2, will be used as the approximate equals of the threshold values of SCr of 1.5 mg/dL or change in SCr of at least 0.3 mg/dL established in large epidemiological studies. The change component of the composite endpoint will be assessed from Months 3 to 12, since post-transplant renal function is largely stable by Month 3.

Other Outcome Measures

[00230] The key secondary objectives are to evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measured GFR at 12 months and on biopsy-proven CAN at 12 months. These endpoints are segregated from other secondary endpoints to emphasize their importance in the evaluation of L104EA29YIg. As discussed above, the functional nephron mass and renal reserve in ECD kidneys are likely to be reduced at the time of transplantation due to donor characteristics (e.g., older age, cardiovascular co-morbidities, procurement procedures, and CIT) with resultant subject and graft survival rates that are well below that observed with standard criteria donor organs. Since renal function is potentially diminished at time of engraftment, it is possible that a substantial proportion of subjects may meet criteria for the co-primary renal function endpoint at the time of study entry or determination of baseline renal allograft function. Accordingly, a key secondary objective of the protocol is to evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, in the difference in measured GFR at 12 months. This key secondary endpoint allows for discernment of the effects of L104EA29YIg, as compared with CsA, irrespective of preexisting donor variability in this ECD population. It also contributes to the evaluation of renal function in total, and strengthens further the conclusion that L104EA29YIg provides a significant medical benefit in renal transplant recipients. The remaining key secondary objective is the biopsy-proven CAN by 12 months. CAN is second only to death with a functioning graft as the leading cause of late renal allograft loss. Paradoxically, CNIs are thought to contribute to CAN through direct (ie, direct nephrotoxic effects) and indirect pathways (ie, adverse cardiovascular and metabolic effects). Due to its

specific mechanism of action, L104EA29YIg is unlikely to be either directly nephrotoxic or adversely alter cardiovascular and metabolic parameters.

[00231] In the Example above, favorable effects were seen in the reduced incidence of CAN among L104EA29YIg-treated subjects . In the current study, establishing a decrease in the incidence of CAN, in conjunction with an improvement in renal function, would strengthen the conclusion that L104EA29YIg provides a significant medical benefit in renal transplant recipients. The efficacy of L104EA29YIg in the prevention of acute rejection will be assessed by a variety of outcome measures. These include its incidence, severity, responsiveness to therapy, and outcome. The interpretation of these measures, however, is complicated by intrinsic differences in L104EA29YIg and CsA. L104EA29YIg is administered at the time of transplant, while CsA is initiated once there is evidence of incipient renal function. It is anticipated that a some subjects randomized to CsA in this study will receive a polyclonal antilymphocyte preparation to provide immunosuppressive coverage if initial renal function is impaired and DGF is anticipated. This therapeutic action may prevent or mask the development of acute rejection in CsA-treated subjects and render the subject unevaluable for the outcome measures of acute rejection. Because it is unnecessary to take similar action in subjects randomized to L104EA29YIg – who are treated from the time of transplant – the comparative assessment of acute rejection is unequal. In order to more accurately assess the efficacy of L104EA29YIg in the prevention of acute rejection, the use of polyclonal lymphocyte preparations in this capacity will also be reported in conjunction with other measures of acute rejection.

Study Population

[00232] The study population includes recipients of renal allografts that are potentially suboptimal due to donor characteristics, procurement procedure, CIT, or other factors. The specific eligibility criteria are based upon the 'expanded criteria' for organ donation issued by UNOS. Recipients of kidneys from donors with prolonged CIT or from DCDs, will also be eligible. In general, immunological criteria will not play a major role in subject selection. Subjects at varying levels of immunological risk are eligible. The study will, however, exclude subjects of greatest immunological risk (positive cross-match, panel reactive antibodies [PRA] of ≥30%, or those previously

transplanted). These subjects may require therapy to reduce their antibody load, such as plasmapheresis, which is beyond the scope of this protocol. Subjects will be enrolled at approximately 90 sites globally.

Primary Efficacy Outcome Measures

1) Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the composite of subject and graft survival at 12 months.

2) Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the composite of measured GFR < 60 mL/min/1.73 m^2 at Month 12 or a decrease in measured GFR ≥10 mL/min/1.73 m^2 from Month 3 to Month 12.

Secondary Efficacy Outcome Measures

1) . Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measured GFR at 12 months.

2) . Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on biopsy-proven CAN by 12 months.

3) Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measured GFR at 3 months, and change from baseline (3 months) to 12 months.

4) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the proportion of subjects with a measured GFR < 30 mL/min/1.73 m^2 at 12 months.

5) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on calculated GFR at 3, 12, 24, and 36 months, and change from baseline (3 months) to 12, 24, and 36 months.

6) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on PTDM at 12, 24, and 36 months.

7) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measures of hypertension at 12, 24, and 36 months, including SBP and DBP, incidence and prevalence of hypertension and controlled hypertension, and intensity of treatment regimen.

8) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measures of dyslipidemia, at 12, 24, and 36 months, including serum total, non-HDL, LDL, and

HDL cholesterol, and TGs, incidence and prevalence of dyslipidemia and controlled dyslipidemia, and intensity of treatment regimen.

9) . Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on subject and graft survival at 24 and 36 months.

10) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measures of acute rejection at 6 months, including the incidence and severity of acute rejection, the use of polyclonal antilymphocyte preparations for impaired renal function and anticipated DGF, the initial use of lymphocyte-depleting therapy for treatment of acute rejection, the incidence of steroid-resistant acute rejection, the incidence of complete recovery (SCr returning to baseline) following acute rejection, the incidence of subclinical rejection, and the incidence of all treated acute rejection episodes regardless of histological findings.

11) . Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on QoL

10)Assess the overall safety of L104EA29YIg, relative to CsA.

Tertiary Outcome Measures

1) Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the slope and intercept of calculated GFR from baseline (3 months) to 12, 24, and 36 months.

2) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the proportion of subjects with a measured GFR < 45 mL/min/1.73 m^2 at 12 months.

3) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the proportion of subjects with < 75 mL/min/1.73 m^2 calculated GFR at Month 12 and subjects with a decrease in calculated GFR from Month 3 to Month 12 of at least 15 mL/min/1.73 m^2.

4) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the incidence of DGF.

5) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measures of acute rejection at 12, 24, and 36 months, including the incidence and severity of acute rejection, the use of polyclonal antilymphocyte preparations for impaired renal function and anticipated DGF, the initial use of lymphocyte-depleting therapy for treatment of acute rejection, and the incidence of steroid-resistant acute rejection, the incidence of complete recovery (SCr returning to baseline) following acute rejection,

the incidence of subclinical rejection, and the incidence of all treated acute rejection episodes regardless of histological findings.

6) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on a composite cardiovascular disease endpoint (adjudicated cardiovascular death, myocardial infarction, ischemic stroke, non-elective hospitalization for cardiovascular cause, and percutaneous coronary intervention) at 12, 24, and 36 months.

7) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on a composite cardiorenal disease endpoint (death, graft loss, non-fatal myocardial infarction, and stroke) at 12, 24, and 36 months.

8) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the Framingham Risk Score at 12, 24, and 36 months.

9) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on incidence of discontinuation of study drug.

10) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on anti-donor HLA antibodies.

11) . Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on C4d positivity in biopsy specimens.

[00233] Definition of Graft Loss Graft loss is defined as either functional loss or physical loss. Functional loss will be defined as a sustained level of SCr ≥6.0 mg/dL (530 ⌈mol/L) as determined by the central laboratory for ≥4 weeks or ≥56 consecutive days of dialysis, or impairment of renal function to such a degree that the subject received a second transplant. All causes of graft loss will be adjudicated by an independent EAC.

[00234] Definition of Delayed Graft Function (DGF) DGF is defined as treatment with dialysis by study Day 8 (post-operative Day 7).

[00235] Definition of Chronic Allograft Nephropathy (CAN) Biopsy-proven CAN will be determined by a blinded central histopathologist using the Banff 97 working classification of kidney transplant pathology. The incidence of CAN will be determined by comparing all post-Day 1 biopsies to baseline biopsies obtained at the time of transplant. This comparison establishes the presence and severity of any preexisting histopathology that may be later interpreted as CAN.

[00236] Definition of Post-transplant Diabetes Mellitus PTDM will be defined according to the definition set forth by a recent international consensus guideline.20 These criteria are summarized as: a)Symptoms of diabetes plus casual plasma glucose (PG) concentration ≥200 mg/dL (11.1 mmol/L) OR b)fasting plasma glucose (FPG) ≥126 mg/dL (7.0 mmol/L) OR c)2-hour PG ≥200 mg/dL (11.1 mmol/L) during an oral glucose tolerance test AND d) a confirmatory laboratory test based on measurements of venous PG must be done on another day in the absence of unequivocal hyperglycemia accompanied by acute metabolic decompensation. The study will utilize FPG for evaluation of PTDM, however, if subjects are evaluated using these other methods and found to meet the above criteria, they will be considered as having PTDM.

[00237] Definition of Measures of Hypertension Hypertension will be as defined in this study according to the Seventh Report of the Joint National Committee on the Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure21 for subjects with chronic kidney disease. This definition is based upon SBP ≥130 mm Hg or DBP ≥80 mm Hg. In addition, all subjects who have a SBP < 130 mm Hg and a DBP < 80 mm Hg who are receiving an antihypertensive medication(s) for the indication of hypertension or with a medical history of hypertension are included in this definition. The incidence of hypertension is defined as the proportion of subjects who develop hypertension after randomization and transplantation. The prevalence of hypertension is defined as the proportion of subjects at any given time who meet the above stated definition of hypertension. Controlled hypertension is defined as a SBP < 130 mm Hg and a DBP < 80 mm Hg while receiving an antihypertensive medication for the indication of hypertension or receiving an antihypertensive medication for another indication with a medical history of hypertension. Subjects with a SBP < 130 mm Hg and a DBP < 80 mm Hg who are prescribed an antihypertensive medication(s) for an indication(s) of other than hypertension (e.g., beta blockers for migraine prophylaxis) with no medical history of hypertension will not be considered to have either hypertension or controlled hypertension. Intensity of treatment regimen is defined as the total number of antihypertensive medications used to control hypertension. All antihypertensive medications will be counted for the indication of

hypertension in subjects with hypertension or controlled hypertension since the antihypertensive effects are present irrespective of indication.

[00238] Definition of Measures of Dyslipidemia Dyslipidemia is defined in accordance with recent guidelines from the National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-K/DOQI).22 Dyslipidemia is defined as hypertriglyceridemia (TGs ε 500 mg/dL [5.65 mmol/L]), hypercholesterolemia (LDL ε 100 mg/dL [2.59 mmol/L]), or elevated non-HDL (non-HDL ε 130 mg/dL [3.36 mmol/L]) in the presence of high TGs (TGs ε 200 mg/dL [2.26 mmol/L Controlled dyslipidemia is defined in this study as subjects who are receiving pharmacological management for one of the above stated dyslipidemias that is successfully treated, and their lipid values fall below the thresholds described in the previous paragraph.. Some of these agents have specific precautions and/or warnings regarding the starting dose or maximal recommended dose with concomitant use of CsA, dosing with renal insufficiency, or may cause alterations of CsA PK. Refer to the appropriate package insert for specific recommendations. Any other agent (ie, non-statin therapy) used as an antihyperlipidemic will be considered Level I treatment intensity. Concomitant use of a statin and an agent of another class (e.g., ezetimibe) will elevate the intensity level of the statin therapy by 1 level; therefore, more than 5 intensity levels are possible.

[00239] Acute rejection will be defined as a clinico-pathological event requiring clinical evidence and biopsy confirmation. Allograft biopsies will be evaluated for the presence and severity of acute rejection by a blinded central independent pathologist using Banff 97 working classification of kidney transplant pathology. In the analyses of acute rejection the biopsy interpretation and grading by the central pathologist will supersede local interpretation. Biopsies performed for suspected acute rejection that do not fully meet the criteria, but are interpreted by the central pathologist as acute rejection and result in treatment for acute rejection, will be counted as acute rejection. Subclinical rejection is defined as histological findings by the central pathologist consistent with acute rejection, but lacking its clinical correlate. Steroid-resistant acute rejection is defined as lack of improvement in the SCr and/or histological findings that necessitate the use of lymphocyte-depletion therapy following treatment

with corticosteroids. Framingham Risk Score This risk score utilizes data from the Framingham Heart Study23 to estimate 10-year risk for 'hard' coronary heart disease (myocardial infarction and coronary death). The risk factors included in this calculation are age, gender, total cholesterol, HDL cholesterol, SBP, diabetes, treatment for hypertension, and any cigarette use in the prior month.

Sample Size Determination

[00240] The primary objective is to estimate the effect of L104EA29YIg on subject and graft survival rates and renal function at 12 months as compared to CsA. The 2 co-primary endpoints are: (1) the proportion of subjects with a surviving graft at 12 months post-transplantation and (2) the proportion of subjects whose measured GFR at 12 months is < 60 mL/min/1.73 m^2, and/or whose measured GFR decreased ≥10 mL/min/1.73 m^2 from Month 3 to Month 12. A sample size of 180 subjects per treatment group will afford 83% power to ascertain that the upper bound of the 97.3% 2-sided CIs for the absolute difference (between each L104EA29YIg regimen and the CsA regimen) in the first co-primary endpoint (subject and graft survival) will not exceed 10%, if the true subject and graft survival rate at 12 months is 80% for the CsA regimen and 83% for each of the 2 L104EA29YIg regimens. For the renal function endpoint, the sample size of 180 subjects per group is powered to detect a decrease of 25% in the proportion of subjects meeting the measured GFR endpoint for each L104EA29YIg regimen as compared with the CsA regimen, assuming 75% of CsA subjects meet the renal function endpoint and 25% drop-outs per treatment group. Overall, 180 subjects per treatment group will afford at least 80% power to detect 1 L104EA29YIg regimen that meets both co-primary endpoints with overall Type I error controlled at the 0.05 significance level (Dunnett adjustment).

Inclusion Criteria

[00241] **Target Population:** 1) The subject is a first-time recipient of a deceased donor kidney transplant 2) The donor and/or donor kidney meet at least 1 of the following extended criteria for organ donation: a) Donor age ≥60 years **OR** b) Donor age 50 – 59 years and 1 of the following: (i) Cerebrovascular accident (CVA) + hypertension + SCr > 1.5 mg/dL **OR** (ii) CVA + hypertension **OR** (iii)CVA + SCr >

1.5 mg/dL **OR** (iv) Hypertension + SCr > 1.5 mg/dL **OR** c) CIT ≥24 hours, donor age > 10 years **OR** d) Donor with cardiac death (non-heart beating donor) 3) Men and women, ages 18 and older, inclusive 4) WOCBP must be using an adequate method of contraception to avoid pregnancy throughout the study and for up to 8 weeks after the study in such a manner that the risk of pregnancy is minimized WOCBP includes any female who has experienced menarche and who has not undergone successful surgical sterilization (hysterectomy, bilateral tubal ligation, or bilateral oophorectomy) or is not postmenopausal (defined as amenorrhea ≥12 consecutive months; or women on hormone replacement therapy with documented serum follicle stimulating hormone level ≥35 mIU/mL). Even women who are using oral, implanted, or injectable contraceptive hormones or mechanical products such as an intrauterine device or barrier methods (diaphragm, condoms, spermicides) to prevent pregnancy or practicing abstinence or where the partner is sterile (e.g., vasectomy), should be considered to be of child bearing potential. WOCBP must have a negative serum pregnancy test (minimum sensitivity 25 IU/L or equivalent units of human chorionic gonadotropin [HCG]) within 72 hours prior to the start of study medication. 5) Men must use an adequate method of contraception throughout the study, and for up to 8 weeks after the last infusion, so that the risk of pregnancy to their partners is minimized.

Exclusion Criteria

[00242] 1) WOCBP who are unwilling or unable to use an acceptable method to avoid pregnancy for the entire study period and for up to 8 weeks after the last infusion. 2) Women who are pregnant or breastfeeding 3) Women with a positive pregnancy test on enrollment or prior to study drug administration 4) Males unwilling or unable to use an adequate method of contraception for the entire study period and for up to 8 weeks after the last infusion of study medication 5) Donor age < 10 years 6) Subjects with underlying renal disease of: a) Focal segmental glomerulosclerosis (biopsy proven) b) Type I or II membranoproliferative glomerulonephritis c) Hemolytic uremic syndrome/thrombotic thrombocytopenic purpura syndrome 7) Subjects with current PRA ≥30% 8) Subjects with a positive T-cell lymphocytotoxic crossmatch 9) Subjects with any prior solid organ transplant (including kidney) 10)

Subjects receiving a concurrent solid organ (heart, liver, pancreas) or cell (islet, bone marrow, stem cell) transplant 11) Subjects receiving paired kidneys from the extended criteria donor (dual kidney transplant) 12) Subjects who are hepatitis C antibody-positive or polymerase chain reaction (PCR)-positive for hepatitis C 13) Subjects who are hepatitis B surface antigen-positive or PCR-positive for hepatitis B 14) Subjects with known human immunodeficiency virus (HIV) infection 15) Subjects with active tuberculosis (TB) requiring treatment within the previous 3 years or any subject who previously required triple (or more) combination therapy for TB. Subjects with a known positive purified protein derivative (PPD) will not be eligible for the study unless they completed treatment for latent TB and have a negative chest x-ray at the time of enrollment. PPD testing done within the last 12 months is acceptable as long as there is documentation of the results. Subjects without a PPD in the last 12 months who have a previous negative result may be enrolled if they also have a negative chest x-ray at enrollment, no symptoms indicative of TB, no known TB contacts, not currently residing in, recently traveled to, or previously immigrated from an area endemic for TB. A PPD response that is ≥10 mm induration or a Heaf score of > 1 in non-Bacille Calmette-Guérin (non-BCG) immunized subjects or > 2 in BCG immunized subjects should be considered a positive test. More conservative criteria may be applied according to the published guidelines and/or local standards endorsed by the medical society 16) Subjects with any active infection or other contraindication that would normally exclude transplantation 17) Subjects whose life expectancy is severely limited by disease state or other underlying medical condition 18) Subjects with a history of cancer (other than non-melanoma skin cell cancers cured by local resection) within the last 5 years 19) Subjects with a history of substance abuse (drug or alcohol) within the past 5 years, or psychotic disorders that are not compatible with adequate study follow-up 20) Subjects with active peptic ulcer disease, chronic diarrhea, or gastrointestinal malabsorption 21) Subjects with local laboratory values that are Common Toxicity Criteria (CTC) Grade II or greater may not participate in the study. However, certain specified laboratory parameters that are exceptions to CTC Grade II will be allowed. The following allowances are noted: Hematology: Hemoglobin may be below CTC Grade II (but not below 8 g/dL) Platelets may be below CTC Grade II, but not below 80,000/mm3 (80 x 109/L) Total white cell blood

(WBC) count may be below CTC Grade II, but not below 3000/mm3 (3 x 109/L) . Granulocyte and lymphocyte counts may be any value Chemistry; SCr and blood urea nitrogen (BUN) values may be any value Blood glucose may be of any value Urinalysis; Urinalysis results may be any value 22) All women 40 years or older and women of any age who have first degree relatives with a history of breast carcinoma or who have other risk factors of breast carcinoma, must have a screening mammogram, or provide results of a screening mammogram performed within 6 months of enrollment. Subjects with a mammogram that is suspicious for malignancy and in whom the possibility of malignancy cannot be reasonably excluded following additional clinical, laboratory, or other diagnostic evaluations will be excluded. If the screening mammogram was not performed within 6 months of enrollment, but the subject is deemed a suitable transplant candidate by local criteria, the baseline mammogram may be obtained within 4 weeks after transplant 23) Subjects who have difficult i.v. access or other reasons that would likely preclude assessment of the co-primary endpoint of measured GFR or subjects that are unlikely (e.g., due to preexisting coagulation issues) or unwilling to undergo the protocol specified 12-month allograft biopsy 24) Subjects with a history of true allergy to i.v. iodinated x-ray contrast agents 25) Subjects who have used any investigational drug within 30 days prior to the Day 1 visit 26) Subjects previously treated with L104EA29YIg 27) Prisoners or subjects who are compulsorily detained (involuntarily incarcerated) for treatment of either a psychiatric or physical (e.g., infectious disease) illness must not be enrolled into this study.

Administration of L104EA29YIg

[00243] Day 1 is defined as the day of transplant (post-transplant Day 0). Infusion of the Day 1 dose should begin after the surgeon has made an initial *intraoperative* assessment, and has concluded that the subject remains a transplant candidate and the transplant will proceed, and before beginning the transplant vascular anastomoses. Infusion doses will be based on the subject's actual body weight at study Day 1, and will not be modified during the course of the study, unless there is a change of body weight ±10% . Study drug should be administered to the subject at a relatively constant rate over 30 minutes. The Day 1 and Day 5 (post-transplant Day 4) doses

should be administered approximately 96 hours apart (±6 hours). Subsequent visit and infusion windows are provided below. For subjects on dialysis, infusion of L104EA29YIg and determination of the subject's weight should occur after dialysis treatment.

[00244] L104EA29YIg MI Regimen: Subjects randomized to the MI regimen will receive i.v. L104EA29YIg (10 mg/kg) on Days 1 and 5, and then every other week for 2 months (Weeks 2, 4, 6, 8, 10, and 12), and then every 4 weeks until 6 months (Weeks 16, 20, and 24). After 6 months, subjects in the MI treatment group will receive L104EA29YIg at the maintenance dose of 5 mg/kg every 4 weeks until completion of the trial at 36 months.

[00245] L104EA29YIg LI Regimen: Subjects randomized to the LI regimen will receive i.v. L104EA29YIg (10 mg/kg) on Days 1 and 5, and then every other week for 2 weeks (Weeks 2 and 4), and then every 4 weeks for 2 months (Weeks 8 and 12). After 3 months, subjects in the LI treatment group will receive L104EA29YIg at the maintenance dose of 5 mg/kg every 4 weeks until completion of the trial at 36 months. Blinding between the LI and MI group will be preserved with the use of 2 placebo infusions in the LI treatment group. Therefore, subjects randomized to the LI regimen will be administered placebo (dextrose 5% in water for injection [D5W]) infusions on Weeks 6 and 10.

Administration of Cyclosporine (CsA)

[00246] The daily dose of CsA should be administered in 2 divided doses on a consistent schedule in relation to time of day and meals. On study visit days, the subject must withhold the morning CsA dose until after trough CsA blood level draws. On study visit days, when the subject is to have standardized BP monitoring and/or measured GFR assessments, these measures are to be completed prior to CsA dosing. The initial daily dose should be 7 ±3 mg/kg (ie, 4 – 10 mg/kg). Subsequent doses should be adjusted to maintain a predefined range of trough serum concentrations: 1st month: target level 150-300 ng/mL After 1st month: target level of 100-250 ng/mL. Monitoring of CsA levels using the plasma concentration 2 hours post-dose (C2) is not to be used in this study. While a recent international consensus statement on management of Neoral by C2 monitoring favored the use of C2

monitoring, it also clearly stated the lack of data regarding the long-term effects on renal function, incidence of CAN, and general safety profile associated with C2 monitoring.24 Furthermore, not all subjects are suitable for C2 monitoring, including subjects with diabetes, slow gastric emptying, or subjects using concomitant medication that alters CsA clearance. Moreover, low C2 levels may result from either true low absorption (in which the CsA dose should be increased) or from slow absorption (in which there is a delayed maximum plasma concentration and an increase in dose may produce toxicity). Finally, this practice is not universal, and prospectively validating this practice is beyond the scope of the current protocol. For additional prescribing information, see the package insert. CsA should be initiated in all subjects by Day 7. For subjects in whom the investigator believes that it is not in the best interest of the subject to initiate CsA at all (e.g., due to impaired renal function), and elects to use a non-study medication (e.g., sirolimus) instead, this action will be considered a discontinuation of study medication.

[00247] For Subjects with Immediate Allograft Function: For subjects randomized to treatment with CsA, the first dose of CsA should be administered as soon as, but not until, there is evidence of adequate allograft function. Adequate allograft function is defined as a decrease in the SCr of at least 1 mg/dL compared to the initial post-transplant value or urine output ≥250 mL in a 12 hour (or less) period post-transplant.

[00248] For Subjects with Impaired Renal Allograft Function and Anticipated DGF: Subjects with postoperative impaired allograft function and anticipated DGF are eligible - but not required - to receive a polyclonal antilymphocyte preparation . Whether a subject receives a polyclonal lymphocyte preparation or not, CsA should be initiated when there is evidence of recovery of allograft function (as defined above) or by Day 7.

Corticosteroids

[00249] All subjects in this study will be treated with daily corticosteroids.

STEROID MAINTENANCE - TAPER Day of transplant (Day 1): methylprednisolone (as sodium succinate) 500 mg i.v. on arrival in the operating room (OR)

[00250] Day 2: methylprednisolone (as sodium succinate) 250 mg i.v.

[00251] Day 3: prednisone (or prednisolone) 100 mg orally (p.o.)

[00252] Day 4 through Day 14 (ie, end of Week 2): taper prednisone (or prednisolone) to 20 - 30 mg p.o. daily

[00253] Day 15 through Month 6: taper prednisone (or prednisolone) no lower than 2.5 mg p.o. daily

[00254] . Subjects must remain on at least 2.5 mg p.o. daily through Year 3.

[00255] The first 2 doses (study Day 1, day of transplant and study Day 2, post-operative Day 1) are to be administered i.v. The remaining doses are to be administered p.o. However, i.v. dosing of an equivalent dose of methylprednisolone is permitted at times when oral dosing is not possible. Such reasons for i.v. rather than p.o. dosing are intercurrent illness, postoperative ileus, or other causes at the investigator's discretion. If methylprednisolone is not available, the use of another i.v. corticosteroid agent dose-equivalent to methylprednisolone is permitted.

Mycophenolate Mofetil Dosing

[00256] All subjects in this study will be treated with MMF. Daily MMF should be administered in 2 divided doses on a consistent schedule in relation to time of day and meals. The dose should be 2 g daily; however, in African Americans, 3 g daily may be administered at the investigator's discretion.25 MMF should be administered p.o. Intravenous dosing is permitted, if needed due to intercurrent illness, postoperative ileus, or other causes at the investigator's discretion. The first dose should be administered preoperatively. Subsequent doses should be administered p.o. as soon as the subject is able to tolerate medications by mouth. The dose and schedule may be adjusted determined on the basis of laboratory values (e.g., decreased WBCs) and subject tolerability (see below). For full prescribing information, see the package insert.

[00257] For subjects who develop nausea, diarrhea, or other MMF-related gastrointestinal adverse effects (e.g., symptoms fully assessed and deemed not to have an etiology other than intolerability to MMF), the MMF dose may be decreased to the maximally tolerated dose. For subjects who develop neutropenia (absolute neutrophil

count < 1.3 x 103/ℓL), dosing with MMF should be interrupted or dose reduced as per the package insert.

Basiliximab Dosing

[00258] All subjects in this study will be treated with the recommended dosing regimen of basiliximab. Basiliximab should be administered through a peripheral or central vein only. Reconstituted basiliximab (20 mg in 5 mL) should be diluted to a volume of 50 mL with normal saline or dextrose 5% and administered as an i.v. infusion over 20-30 minutes. The first 20 mg dose should be administered on Day 1 (the day of transplantation; post-operative Day 0). For subjects randomized to L104EA29YIg, this first basiliximab infusion should occur as soon as possible after completion of the L104EA29YIg infusion. The second 20 mg dose should be given on Day 5 (post-operative Day 4). The second basiliximab dose should not be administered to subjects if they have received or are expected to receive a lymphocyte-depleting treatment. For additional information, see the package insert.

Polyclonal Antilymphocyte Preparations for Impaired Renal Allograft Function and Anticipated DGF

[00259] The use of polyclonal antilymphocyte preparations (Thymoglobulin or ATGAM) is permitted - but not required - for subjects randomized to CsA who experience impaired renal allograft function and anticipated DGF following transplantation. Use of other polyclonal antilymphocyte preparations or polyclonal antithymocyte globulins is permitted in regions where market authorization exists, and if they are indicated for the treatment of acute rejection in renal transplantation. Of note, OKT3 is not to be used for this purpose, but may be used for treatment of Banff 97 Grade IIb or greater acute rejection or steroid-resistant acute rejection . Use of Campath 1-H® (alemtuzumab) is not permitted in this protocol, as it is not indicated for use in kidney transplantation. These agents are widely utilized in this capacity to afford immunosuppression until graft function allows for administration of CsA . Therefore, polyclonal antilymphocyte preparations may be used in this clinical setting, at the investigator's discretion, in subjects who meet ≥1 of the following criteria that are observed in the presence of a patent transplant artery and vein and no evidence of

nydronephrosis by sonogram: a)Urine output < 250 cc/12 hours b)No significant improvement (< 1 mg/dL) in SCr from baseline value over the first 24 - 72 hours post-transplant c)Dialysis treatment. Use of these agents for impaired renal allograft function and anticipated DGF is not permitted in L104EA29YIg-treated subjects.

Sulfamethoxazole/Trimethoprim Dosing

[00260] All subjects who participate in this study who have no contraindications should receive sulfamethoxazole/trimethoprim prophylaxis to prevent urinary tract and *Pneumocystis carinii* infections. Dosing and administration are to be determined by the level of renal function consistent with the package insert. Subjects with a contraindication or intolerance to sulfa drugs or trimethoprim may receive prophylactic therapy with inhaled pentamidine at the investigator's discretion. For full prescribing information, see the package inserts.

Valganciclovir / Ganciclovir, Acyclovir / Valacyclovir Dosing

[00261] All recipients who have no contraindications to valganciclovir, ganciclovir, acyclovir, and valacyclovir should be prophylactically treated with these drugs to prevent infections due to CMV and *Herpes simplex*. The following are guidelines for dosing and duration of prophylactic treatment:

[00262] Prophylaxis for the First 10 Days Post-transplant or During T-cell-depleting Therapy: All transplant subjects will receive valganciclovir or ganciclovir per protocol for 10 days after surgery. If treated with T-cell-depleting therapy for induction therapy or treatment for acute rejection , the subject will receive valganciclovir or ganciclovir for the duration of the T-cell-depleting therapy. If the subject is discharged prior to 10 days, either oral valganciclovir, ganciclovir, valacyclovir, or acyclovir will begin based on CMV immune status as described below.

[00263] Valganciclovir for Prophylaxis: **Creatinine Clearance** ≥60 mL/min , dose 900 mg daily; **Creatinine Clearance** 40 - 59 mL/min, dose 450 mg daily; **Creatinine Clearance** < 40 mL/min, dose 450 mg every other day.

[00264] Ganciclovir for Prophylaxis: If the subject is unable to tolerate oral medications, or valganciclovir is not available for use, ganciclovir suspension or

capsules may be substituted. **Creatinine Clearance** ≥70 mL/min, dose 1 g 3 times daily; **Creatinine Clearance** 50 - 69 mL/min, dose 500 mg 3 times daily; **Creatinine Clearance** 25 - 49 mL/min, dose 500 mg twice daily; **Creatinine Clearance** 10 - 24 mL/min, dose 500 mg daily; **Creatinine Clearance** < 10 mL/min, dose 500 mg after hemodialysis 3 times/week. If i.v. ganciclovir is needed, see the package insert for dosing.

[00265] Prophylaxis After 10 Days Post-transplant Through at Least 3 Months: CMV Antibody Seropositive Donor to a CMV Antibody Seronegative Recipient: Continue valganciclovir or ganciclovir protocol listed above for ≥3 months.

[00266] CMV Antibody Seropositive or Seronegative Donor to a CMV Antibody Seropositive Recipient: Oral acyclovir for ≥3 months post-transplantation: **Serum Creatinine** ≥50 mL/min, dose 800 mg orally 4 times daily; **Serum Creatinine** 25 - 49 mL/min, dose 800 mg orally 3 times daily; **Serum Creatinine** 11 - 24 mL/min, dose 800 mg orally twice daily; **Serum Creatinine** < 10 mL/min, dose 800 mg orally daily; On hemodialysis, dose 800 mg daily after hemodialysis

[00267] Valacyclovir may be substituted for acyclovir at the time of discharge for subject convenience. **Serum Creatinine** ≥50 mL/min, dose 500 mg orally 2 times daily; **Serum Creatinine** 25 - 49 mL/min, dose 500 mg orally daily; **Serum Creatinine** 11 - 24 mL/min, dose 500 mg orally daily; **Serum Creatinine** < 10 mL/min, dose 250 mg orally daily; On hemodialysis, dose 250 mg daily after hemodialysis

[00268] CMV Antibody Seronegative Donor to a CMV Antibody Seronegative Recipient: Oral Acyclovir Protocol Needed for Herpes Prophylaxis Only: continue for ≥3 months post-transplantation. Acyclovir 400 mg p.o. twice daily or valacyclovir may be substituted for acyclovir at the time of discharge for subject convenience. For full prescribing information, refer to the package inserts.

Infusion-only Visit Procedures

a) For subjects randomized to L104EA29YIg treatment: A negative pregnancy test is required prior to L104EA29YIg administration. The dose is to be

based on the subject's weight at the most recent previous study visit. Subjects should be monitored for vital signs (pre- and post-infusion), and AEs should be assessed. PK samples may be required at some visits.

b) For subjects randomized to CsA treatment: Subjects shall be contacted to assess for AEs only. This visit can be a telephone contact, and should occur within the prescribed visit window for the specified visit.

Visit Windows

a) For subjects randomized to L104EA29YIg treatment: the Days 1 and 5 doses should be administered approximately 96 hours apart(± 6 hours). To facilitate scheduling the infusion-only visits, the following windows are permitted for subsequent doses: **Visit** Week 2, **Visit Window** target date ± 2 days; **Visit** Week 4 - Month 6 **Visit Window** target date ± 3 days, **Visit** Month 7 – Month 36, **Visit Window** target date ± 5 days; **Visit** follow-up 8 weeks, **Visit Window** target date ± 5 days.

b) For subjects randomized to CsA treatment: After Day 5, subjects are only required to attend clinic visits at Weeks 2, 4, 8, and 12; then at every 3-month interval visit. At the non-3-month interval visits (ie, Weeks 6, 10, 16, 20, 28, 32, etc), a telephone contact will be conducted to collect AE information. Clinic and contact visits shall occur within the same visit windows as specified above for subjects randomized to L104EA29YIg. The target dates for the 3- and 12-month GFR assessments are Week 12 ± 14 days and Week 52 ± 14 days. Under certain circumstances, and with the prior approval of the medical monitor, the measured GFR assessments at Month 3 and Month 12 may be conducted through Month 6 and Month 15, respectively. Such reasons that may warrant extension of a measured GFR assessment include the presence of a concurrent acute rejection episode or the need to repeat an assessment for technical reasons.

[00269] The target date for the 12-month allograft biopsy is Week 52 ± 14 days. Similarly, under certain circumstances and with the prior approval of the medical monitor, the allograft biopsy may be obtained through Month 15. Such reasons that may warrant extension of an allograft biopsy include temporary need for anticoagulation.

EXAMPLE 5

[00270] One knowledgeable in the art could utilize the administration schedule described in Example 4 above to design a study comprising a different study population, donor criteria and/or objectives. For example, this transplant study will evaluate subjects receiving a kidney transplant from a living donor or deceased donor with anticipated cold-ischemic time < 24 hours. Subjects at varying levels of immunological risk will be eligible. However, the study will exclude subjects of greatest immunological risk. Subjects will be randomized to the MI, LI or CsA arms as described above in Example 4.

Primary Objectives

[00271] Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the composite of subject and graft survival by 12 months. Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the composite of measured GFR < 60 mL/min/1.73 m^2 at Month 12 or a decrease in measured GFR ≥10 mL/min/1.73 m^2 from Month 3 to Month 12. Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the incidence of acute rejection by 12 months.

Secondary Objectives

[00272] Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measured GFR at 12 months. Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on biopsy-proven CAN at 12 months. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the individual components of the primary composite endpoint of measured GFR < 60 mL/min/1.73 m^2 at Month 12 or a decrease in measured GFR ≥10 mL/min/1.73 m^2 from Month 3 to Month 12. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the triple composite endpoint of death, graft loss, and acute rejection by 12, 24, and 36 months. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the proportion of subjects with a measured GFR < 60 mL/min/1.73 m^2 at 24 months Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measured GFR at 3 and 24 months, and change from baseline (3 months) to 12 months and to 24 months. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the proportion of subjects with a measured

GFR < 30 mL/min/1.73 m^2 at 12 and 24 months. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on calculated GFR at 6, 12, 24, and 36 months, and change from 6 months to 12, 24, and 36 months. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on PTDM by 12, 24, and 36 months. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measures of hypertension at 12, 24, and 36 months, including SBP and DBP, incidence and prevalence of hypertension and controlled hypertension, and intensity of treatment regimen. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measures of dyslipidemia, at 12, 24, and 36 months, including serum total, non-HDL, low-density lipoprotein (LDL), and HDL cholesterol, and TGs, incidence and prevalence of dyslipidemia and controlled dyslipidemia, and intensity of treatment regimen. Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on subject and graft survival by 24 and 36 months. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the proportion of subjects with a calculated GFR < 60 mL/min/1.73 m^2 at 24 and 36 months. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on measures of acute rejection by 6, 12, 24, and 36 months, including the incidence and severity of acute rejection, the use of polyclonal antilymphocyte preparations for impaired renal function and anticipated delayed graft function (DGF), the initial use of lymphocyte-depleting therapy for treatment of acute rejection, the incidence of steroid-resistant acute rejection, the incidence of complete recovery (SCr returning to baseline) following acute rejection, the incidence of subclinical rejection, the incidence of all treated acute rejection episodes regardless of histological findings, and the time to onset of acute rejection. Evaluate the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on QoL. Assess the overall safety of L104EA29YIg, relative to CsA. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the slope and intercept of calculated GFR from 3 months to 12, 24, and 36 months. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the proportion of subjects with < 60 mL/min/1.73 m^2 calculated GFR at Month 12 or subjects with a decrease in calculated GFR from Month 3 to Month 12 of at least 10 mL/min/1.73 m^2. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the incidence of DGF. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the proportion of subjects with Stage 1 through Stage 5 chronic kidney disease at 12 and 24 months as assessed by measured GFR. Assess the effects of L104EA29YIg,

relative to CsA, on the proportion of subjects with Stage 1 through Stage 5 chronic kidney disease at 36 months as assessed by calculated GFR. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on a composite cardiovascular disease endpoint (adjudicated cardiovascular death, myocardial infarction, ischemic stroke, and revascularization [surgical or percutaneous] procedures) by 12, 24, and 36 months. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on a composite cardiorenal disease endpoint (death, graft loss, non-fatal myocardial infarction, and stroke) by 12, 24, and 36 months. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on the Framingham Risk Score at 12, 24, and 36 months. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on incidence of discontinuation of study drug. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on anti-donor human leukocyte antigen (HLA) antibodies. Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on angiotensin II type 1 (AT1)– receptor antibodies Assess the effects of L104EA29YIg, relative to CsA, on C4d positivity in biopsy specimens

Study Design

[00273] The duration of the study is 3 years with a subsequent 8-week follow-up period for safety evaluations. This is a randomized, partially-blinded, active-controlled, parallel-group study. All subjects will receive a kidney transplant from a living donor or a deceased donor with an anticipated CIT < 24 hours.

[00274] Approximately 660 subjects will be randomized in a 1:1:1 ratio to treatment with either L104EA29YIg (MI regimen), L104EA29YIg (LI regimen), or CsA. All subjects will also receive induction with basiliximab and a background maintenance immunosuppressive regimen of MMF and corticosteroids. Subjects randomized to the MI regimen will receive i.v. L104EA29YIg (10 mg/kg) on Days 1and 5, then every 2 weeks through Month 3 (Weeks 2, 4, 6, 8, 10, and 12), and then every 4 weeks through 6 months (Weeks 16, 20, and 24). After 6 months, subjects in the MI treatment group will receive the maintenance dose of L104EA29YIg 5 mg/kg administered every 4 weeks until completion of the trial at 36 months. Subjects randomized to the LI regimen will receive i.v. L104EA29YIg (10 mg/kg) on Days 1and 5, and then every 2 weeks through Month 1 (Weeks 2 and 4), and every 4 weeks through Month 3 (Weeks 8 and 12). After 3 months, subjects in the LI treatment

group will receive the maintenance dose of L104EA29YIg 5 mg/kg administered every 4 weeks until completion of the trial at 36 months. Blinding between the LI and MI groups will be preserved with the use of placebo infusions in the LI treatment group on Weeks 6 and 10.Subjects randomized to CsA will receive doses twice daily that are designed to achieve a specified trough serum concentration range consistent with current medical practice. The safety and efficacy of L104EA29YIg will be assessed at 1, 2, and 3years. An independent DSMB will review data from the study on an ongoing basis, and make recommendations for altering the conduct of the trial, if necessary.

Study Population

[00275] The study population includes recipients of renal allografts from living donors or deceased donors with an anticipated CIT < 24 hours. In general, immunological criteria will not play a major role in subject selection. Subjects at varying levels of immunological risk are eligible. The study will, however, exclude subjects of greatest immunological risk (positive cross match, current panel reactive antibodies [PRA] of ≥50%, or those previously transplanted with a current PRA ≥30%). These subjects may require therapy to reduce their antibody load, such as plasmapheresis, which is beyond the scope of this protocol. Subjects will be enrolled at approximately 100 sites globally.

Inclusion Criteria

[00276] **Target Population:** 1) The subject is a recipient of a living donor or deceased donor kidney transplant with an anticipated CIT < 24 hours 2) Men and women, ages 18 and older, inclusive 3) WOCBP must be using an adequate method of contraception to avoid pregnancy throughout the study and for up to 8 weeks after the study in such a manner that the risk of pregnancy is minimized WOCBP includes any female who has experienced menarche and who has not undergone successful surgical sterilization (hysterectomy, bilateral tubal ligation, or bilateral oophorectomy) or is not postmenopausal (defined as amenorrhea for 12 consecutive months; or women on hormone replacement therapy [HRT] with documented serum follicle stimulating hormone [FSH] level ≥35 mIU/mL). Even women who are using

oral, implanted, or injectable contraceptive hormones or mechanical products such as an intrauterine device or barrier methods (diaphragm, condoms, spermicides) to prevent pregnancy or practicing abstinence or where the partner is sterile (e.g., vasectomy), should be considered to be of childbearing potential. WOCBP must have a negative serum pregnancy test (minimum sensitivity 25 IU/L or equivalent units of human chorionic gonadotropin [HCG]) within 72 hours prior to the start of study medication.

Exclusion Criteria

[00277] 1) WOCBP who are unwilling or unable to use an acceptable method to avoid pregnancy for the entire study period and for up to 8 weeks after the last infusion. 2) Women who are pregnant or breastfeeding. 3) Women with a positive pregnancy test on enrollment or prior to study drug administration. 4) Genetically-identical donor recipient pairs (ie, identical twins). 5) Donor age < 10 years. 6) Subjects receiving and extended criteria donor organ as defined by: a) Donor age ≥60 years **OR** b) Donor age 50 – 59 years and 1 of the following: (i) Cerebrovascular accident (CVA) + hypertension + SCr > 1.5 mg/dL **OR** (ii) CVA + hypertension **OR** (iii) CVA + SCr > 1.5 mg/dL **OR** (iv) Hypertension + SCr > 1.5 mg/dL **OR** c) Anticipated CIT ≥24 hours **OR** d) Donor with cardiac death (non-heart beating donor). 7) Subjects with underlying renal disease of: a) Primary focal segmental glomerulosclerosis b) Type I or II membranoproliferative glomerulonephritis c) Hemolytic uremic syndrome (HUS) / thrombotic thrombocytopenic purpura syndrome If a subject has ESRD of unknown etiology and/or has no histologically-confirmed diagnosis, the subject may be enrolled into the study as long as there are no clinical signs or symptoms consistent with the clinical diagnosis of primary focal segmental glomerulosclerosis, Type I or II membranoproliferative glomerulonephritis, or HUS, as deemed by the investigator. 8) Subjects undergoing primary (first-time) transplant with a current PRA ≥50%, or subjects undergoing retransplantation with a PRA ε 30%. 9) Subjects with previous graft loss due to acute rejection. 10) Subjects with a positive T-cell lymphocytotoxic cross match. 11) Subjects with prior non-renal solid organ transplant (subjects undergoing kidney retransplantation are eligible pending other study criteria being met), or subjects undergoing multi-organ

transplants (e.g., kidney-pancreas) or subjects deemed likely to have a second solid organ or cell transplant (e.g., pancreas or islet transplant) in the next 3 years by the investigator. 12) Subjects receiving a concurrent solid organ (heart, liver, pancreas) or cell (islet, bone marrow, stem cell) transplant. 13) Subjects receiving paired kidneys (dual or *en bloc* kidney transplants). 14) Subjects who are known hepatitis C antibody-positive or polymerase chain reaction (PCR)-positive for hepatitis C. 15) Subjects who are known hepatitis B surface antigen-positive or PCR-positive for hepatitis B. 16) Subjects with known human immunodeficiency virus (HIV) infection. 17) Subjects with active tuberculosis (TB) requiring treatment within the previous 3 years or any subject who previously required triple (or more) combination therapy for TB. Subjects with a known positive purified protein derivative (PPD) will not be eligible for the study unless they completed treatment for latent TB and have a negative chest x-ray at the time of enrollment. PPD testing done within the last 12 months is acceptable as long as there is documentation of the results. Subjects without a PPD in the last 12 months who have a previous negative result may be enrolled if they also have a negative chest x-ray at enrollment, no symptoms indicative of TB, no known TB contacts, is not currently residing in, recently traveled to, or previously immigrated from an area endemic for TB. A PPD response that is ≤10 mm induration or a Heaf score of > 1 in non-Bacille Calmette-Guérin (non-BCG) immunized subjects or > 2 in BCG immunized subjects should be considered a positive test. More conservative criteria may be applied according to the published guidelines and/or local standards endorsed by the medical society. 18) Subjects with any active infection or other contraindication that would normally exclude transplantation. 19) Subjects whose life expectancy is severely limited by disease state or other underlying medical condition. 20) Subjects with a history of cancer (other than non-melanoma skin cell cancers cured by local resection) within the last 5 years. 21) Subjects with a history of substance abuse (drug or alcohol) within the past 5 years, or psychotic disorders that are not compatible with adequate study followup. 22) Subjects with active peptic ulcer disease, chronic diarrhea, or gastrointestinal malabsorption.

[00278] Administration of and visit windows for L104EA29YIg MI and LI and CsA regimens, including list as required, will be as described above and in Example 4.

[00279] As will be apparent to those skilled in the art to which the invention pertains, the present invention may be embodied in forms other than those specifically disclosed above without departing from the spirit or essential characteristics of the invention. The particular embodiments of the invention described above, are, therefore, to be considered as illustrative and not restrictive. The scope of the present invention is as set forth in the appended claims rather than being limited to the examples contained in the foregoing description.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. A method for treating an immune disorder associated with graft transplantation comprising administering to a subject an effective dose of a CTLA4 mutant molecule comprising an extracellular domain of CTLA4 as shown in SEQ ID NO:8 beginning with alanine at position 26 or methionine at position 27 and ending with aspartic acid at position 150, or a portion thereof, wherein in the extracellular domain or portion thereof an alanine at position 55 is substituted with a tyrosine, and a leucine at position 130 is substituted with a glutamic acid and wherein the administration regimen comprises an early phase regimen, wherein the early phase regimen may range from the first 3 to 6 months post-transplantation and involves administration that initially is more frequent than monthly.

2. A method for treating an immune disorder associated with graft transplantation comprising administering to a subject an effective dose of a CTLA4 mutant molecule comprising:

(a) an amino acid sequence beginning with methionine at position 27 and ending with aspartic acid at position 150 of SEQ ID NO:4, or

(b) an amino acid sequence beginning with alanine at position 26 and ending with aspartic acid at position 150 of SEQ ID NO:4 and

wherein the CTLA4 mutant molecule administration regimen comprises an early phase regimen, wherein the early phase regimen may range from the first 3 to 6 months post-transplantation and involves administration that initially is more frequent than monthly.

3. The method according to claim 1or 2 wherein the early phase administration regimen comprises administration of CTLA4 mutant molecule on day 1, week 2 visit, week 4 visit, week 8 visit and week 12 visit.

4. The method according to claim 3 wherein the early phase administration regimen comprises administration of CTLA4 mutant molecule on day 5.

5. The method according to claim 4 wherein the early phase administration regimen comprises administration of CTLA4 mutant molecule on week 6 visit, week 10 visit, month 4 visit, month 5 visit and month 6 visit.

6. The method according to claims 3, 4 or 5 wherein the administration regimen further comprises a maintenance phase regimen wherein the maintenance phase regimen begins after the early phase regimen ends and wherein administration of CTLA4 mutant molecule is not more frequent than monthly.

7. The method according to claim 3, 4 or 5 wherein the effective dose of CTLA4 mutant molecule during the early phase is about 10 mg/kg weight of the subject.

8. The method according to claim 6 wherein the effective dose of CTLA4 mutant molecule during the maintenance phase is about 5 mg/kg weight.

9. The method according to claim 1 or 2 wherein the effective dose of the CTLA4 mutant molecule is about 10mg/kg weight of the subject with an administration regimen comprising administration on days 1, 15, 29, 57, 85 and 5gm/kg monthly thereafter.

10. The method according to claim 1 or 2 wherein the effective dose of the CTLA4 mutant molecule is about 10mg/kg weight of the subject with an administration regimen comprisng administration on days 1, 5, 15, 29, 57, 85 and 5mg/kg monthly thereafter.

11. The method according to claim 1 or 2 wherein the effective dose of the CTLA4 mutant molecule is about 10 mg/kg weight of the subject with an administration regimen comprising administration on days1, 5, 15, 29, 43, 57, 71, 85, 113, 141, 169 and 5 mg/kg monthly thereafter.

12. The method according to claim 1 or 2 wherein the immune disorders associated with graft transplantation comprises solid organ, tissue and/or cell transplant rejection.

13. The method according to claim 12 wherein the immune disorders associated with graft transplantaion comprises kidney transplant rejection.

14. The method according to claim 1 or 2 wherein the CTLA4 mutant molecules further comprise an amino acid sequence which alters the solubility, affinity and/or valency of the soluble CTLA4 mutant molecule.

15. The method according to claim 14, wherein the amino acid sequence which alters the solubility, affinity and/or valency comprises an immunoglobulin moiety.

16. The method according to claim 15, wherein the immunoglobulin moiety is an immunoglobulin constant region or portion thereof.

17. The method according to claim 16, wherein the immunoglobulin constant region or portion thereof is mutated to reduce effector function.

18. The method according to claim 16 wherein the immunoglobulin constant region or portion thereof comprises a hinge, CH2 and CH3 regions of a human or monkey immunoglobulin molecule.

19. The method according to claim 17 wherein the immunoglobulin constant region or portion thereof comprises a hinge, CH2 and CH3 regions of a human or monkey immunoglobulin molecule.

20. The method according to claim 15, wherein the immunoglobulin comprises an amino acid sequence which begins with glutamic acid at position +152 and ends with lysine at position +383, as shown in SEQ ID NO:4.

21. The method according to claims 1 or 2 further comprising a junction amino acid residue and an immunoglobulin, where the junction amino acid residue is located between the amino acid sequence which ends with aspartic acid at position +150 and the immunoglobulin.

22. The method according to claim 1 or 2 wherein said CTLA4 mutant molecule is co-administered with at least one of the agents selected from the group consisting of basiliximab , daclizumab, anti-thymocyte globulin, calcineurin inhibitors, cyclosporine, tacrolimus, mycophenolate mofetil, mycophenolic acid, rapamycin, azathioprine, muromonab, rituximab, sirolmus, everolimus, FTY720, FK778, Jak-3, centican, corticosteroids, betamethasone, budesonide, cortisol, cortisone, dexamethasone, hydrocritisone, methylprednisolone, prednisolone, prednisone and triamcinolone.

23. A method according to claim 1 or 2 wherein development and/or progression of an outcome selected from the group consisting of CAN, hyperlipidemia, hypertension, diabetes, hirsuitism, alopecia, gingival hyperplasia, tremor, neurotoxicity and bone loss is reduced.

24. The method according to claim 1 or 2 further comprising a target trough serum concentration of the CTLA4 mutant molecule between about 3μg/ml and about 30μg/ml.

25. A method for treating an immune disorder associated with graft transplantation comprising administering to a subject an effective dose of a CTLA4 mutant molecule comprising:

(a) an amino acid sequence beginning with methionine at position 27 and ending with lysine at position +357 or glycine at position +356 of Figure 7, or

(b) an amino acid sequence beginning with alanine at position 26 and ending with lysine at position +357 or glycine at position +356 of Figure 7 and

wherein the CTLA4 mutant molecule administration regimen comprises an early phase regimen, wherein the early phase regimen may range from the first 3 to 6 months post-transplantation and involves administration that initially is more frequent than monthly.

26. The method according to claim 1, 2 or 25 wherein the CTLA4 mutant molecule is co-administered concomitantly or sequentially with agents comprising basiliximab and MMF.

27. The method according to claim 1, 2 or 25 wherein the CTLA4 mutant molecule is co-administered concomitantly or sequentially with agents comprising daclizumab and siroliums.

FIG. 1

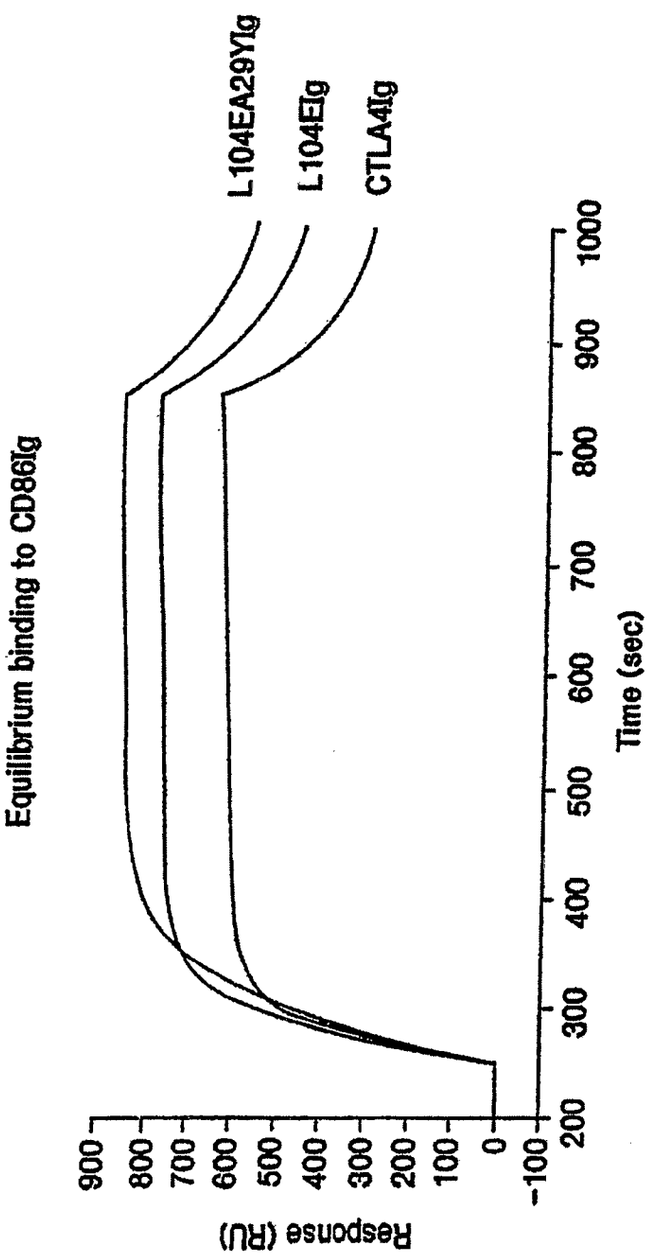

Equilibrium binding to CD86Ig
L104EA29YIg
L104EIg
CTLA4Ig
Response (RU)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
Time (sec)

FIG. 2A

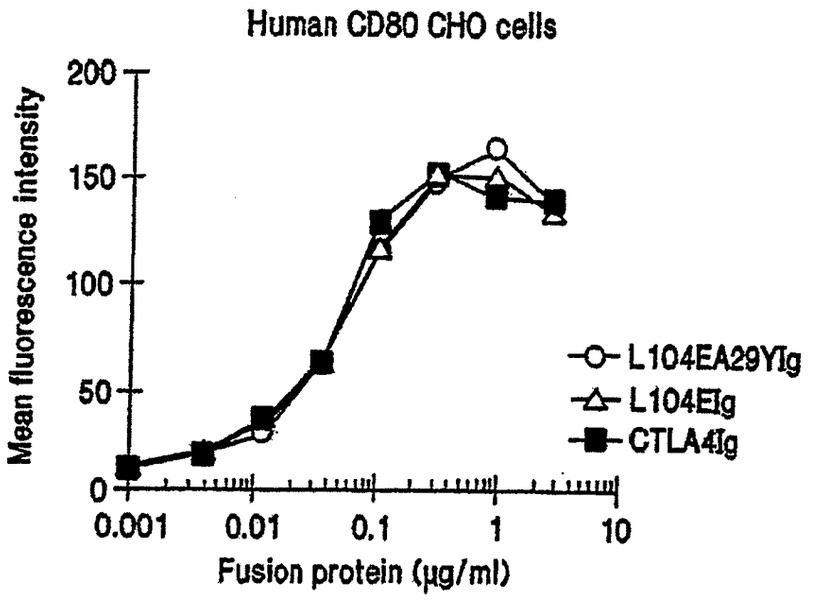

Human CD80 CHO cells
Mean fluorescence intensity
200
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Fusion protein (µg/ml)
L104EA29YIg
L104EIg
CTLA4Ig

FIG. 2B

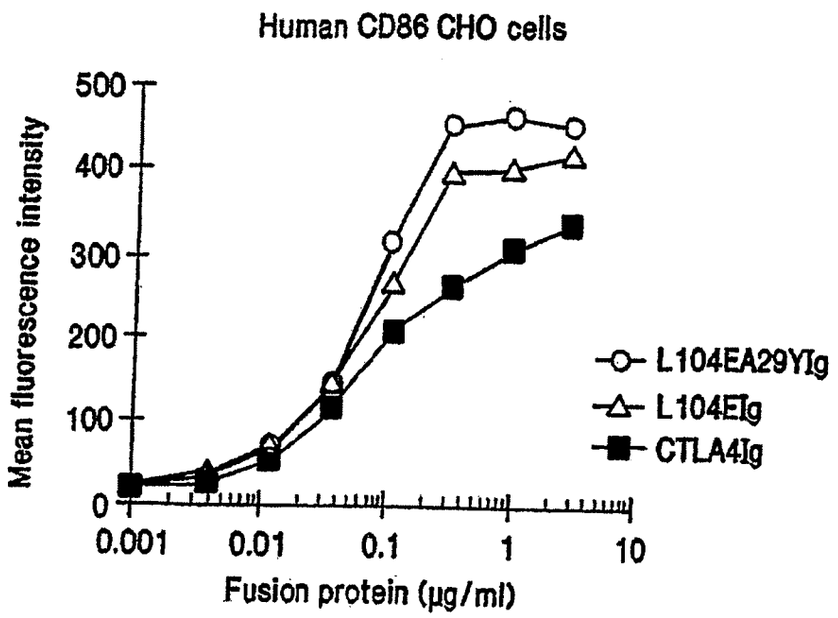

Human CD86 CHO cells
Mean fluorescence intensity
500
400
300
200
100
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Fusion protein (µg/ml)
L104EA29YIg
L104EIg
CTLA4Ig

FIG. 3A

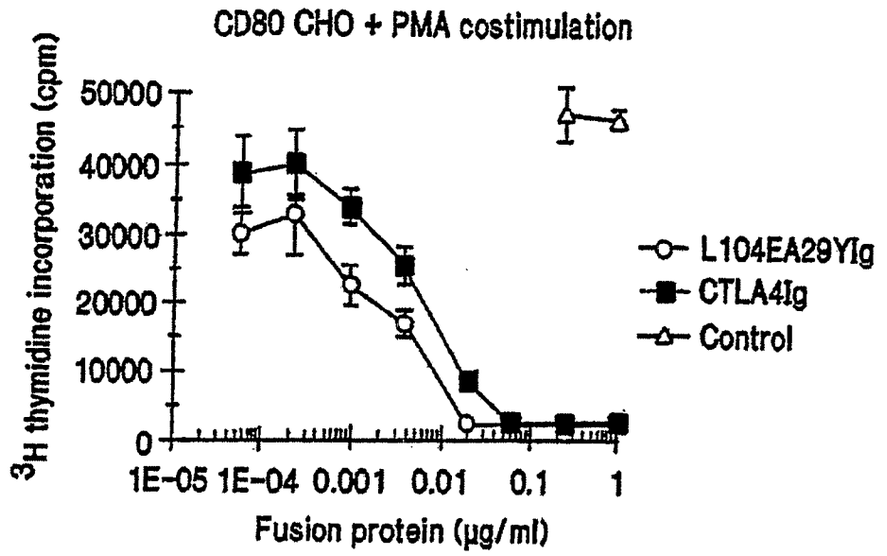

CD80 CHO + PMA costimulation
^{3}H thymidine incorporation (cpm)
50000
40000
30000
20000
10000
0
1E-05 1E-04 0.001 0.01 0.1 1
Fusion protein (µg/ml)
L104EA29YIg
CTLA4Ig
Control

FIG. 3B

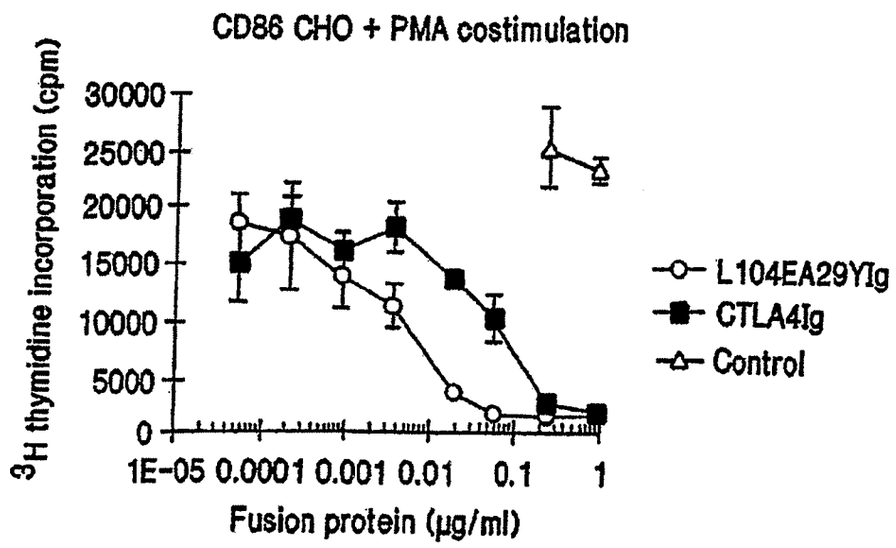

CD86 CHO + PMA costimulation
^{3}H thymidine incorporation (cpm)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
1E-05 0.0001 0.001 0.01 0.1 1
Fusion protein (µg/ml)
L104EA29YIg
CTLA4Ig
Control

FIG. 4A

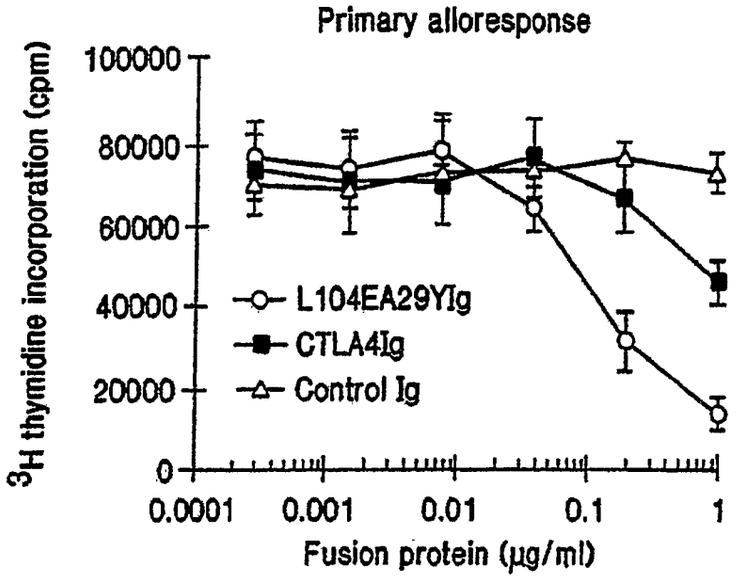

Primary alloresponse
^{3}H thymidine incorporation (cpm)
100000
80000
60000
40000
20000
0
L104EA29YIg
CTLA4Ig
Control Ig
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
Fusion protein (µg/ml)

FIG. 4B

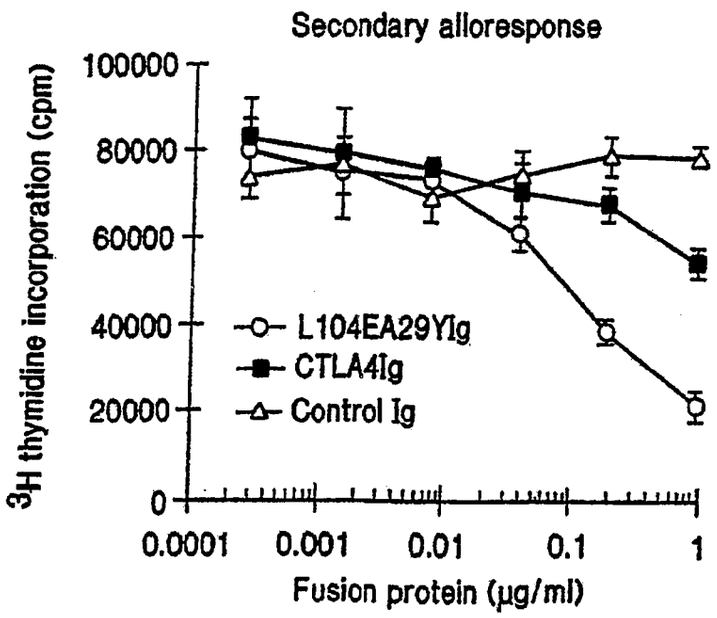

Secondary alloresponse
^{3}H thymidine incorporation (cpm)
100000
80000
60000
40000
20000
0
L104EA29YIg
CTLA4Ig
Control Ig
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
Fusion protein (µg/ml)

FIG. 5A

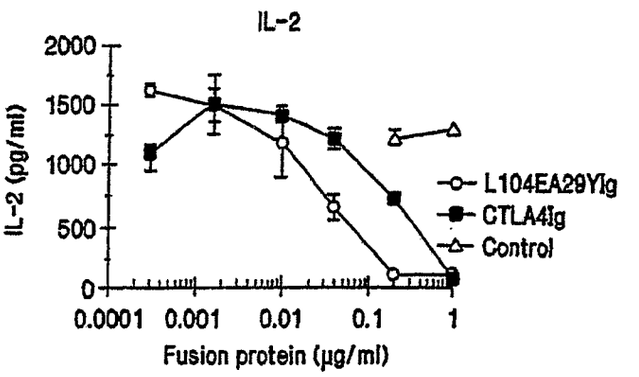


FIG. 5B

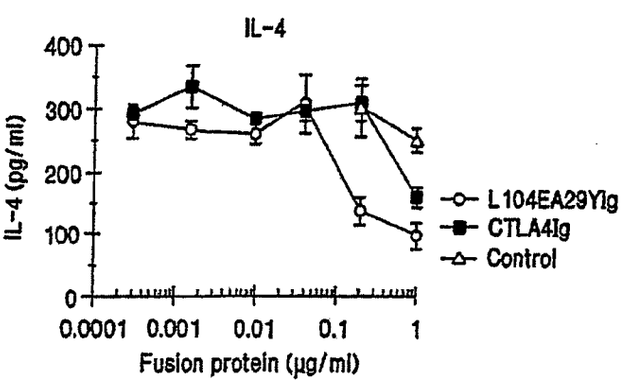


FIG. 5C

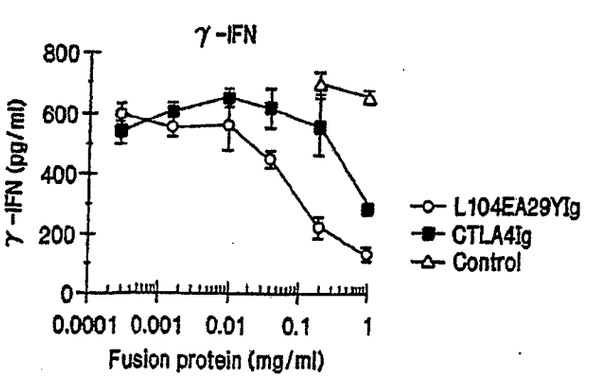


FIG. 6

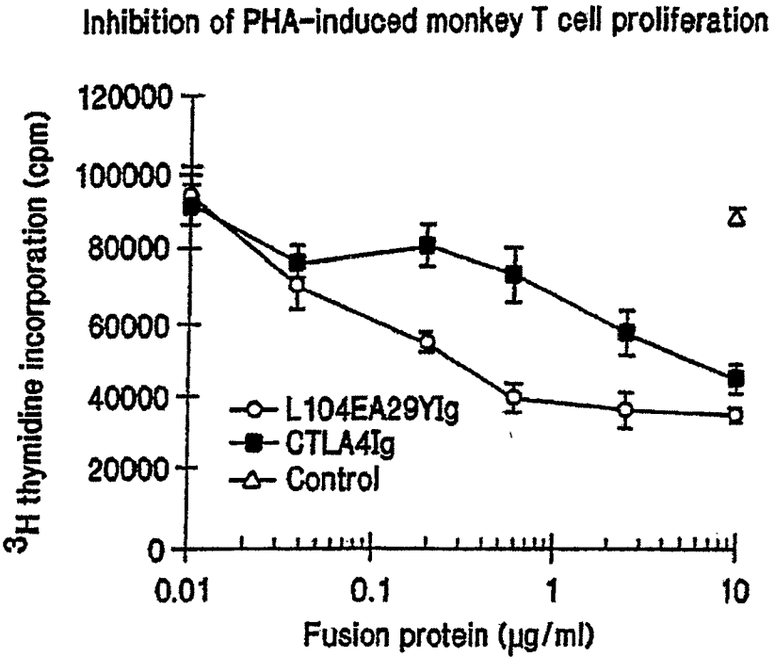

Inhibition of PHA-induced monkey T cell proliferation
^{3}H thymidine incorporation (cpm)
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
Fusion protein (μg/ml)
L104EA29YIg
CTLA4Ig
Control

FIG. 7

```
ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA      -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--      -7

AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA      +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--      +14
                +1

GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG      +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V--      +34

ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG      +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--      +54

GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA      +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--      +74

GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG      +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--      +94

GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA      +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--      +114

ATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC      +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--      +134

ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC      +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--      +154

CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG      +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--      +174

GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG      +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--      +194

CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC      +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--      +214

GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC      +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--      +234

AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA      +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--      +254

GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC      +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--      +274

CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT      +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--      +294

GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC      +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--      +314

TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA      +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--      +334

TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT      +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--      +354

CCGGGTAAATGA
P--G--K--*
```

FIG. 8

```
ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA      -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--      -7

AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA      +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--      +14
                +1

GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG      +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--      +34

ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG      +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--      +54

GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA      +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--      +74

GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG      +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--      +94

GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA      +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--L--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--      +114

ATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC      +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--      +134

ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGTGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC      +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--      +154

CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG      +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--      +174

GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG      +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--      +194

CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC      +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--      +214

GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC      +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--      +234

AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA      +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--      +254

GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC      +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--      +274

CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT      +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--      +294

GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC      +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--      +314

TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA      +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--      +334

TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT      +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--      +354

CCGGGTAAATGA
P--G--K--*
```

FIG. 9

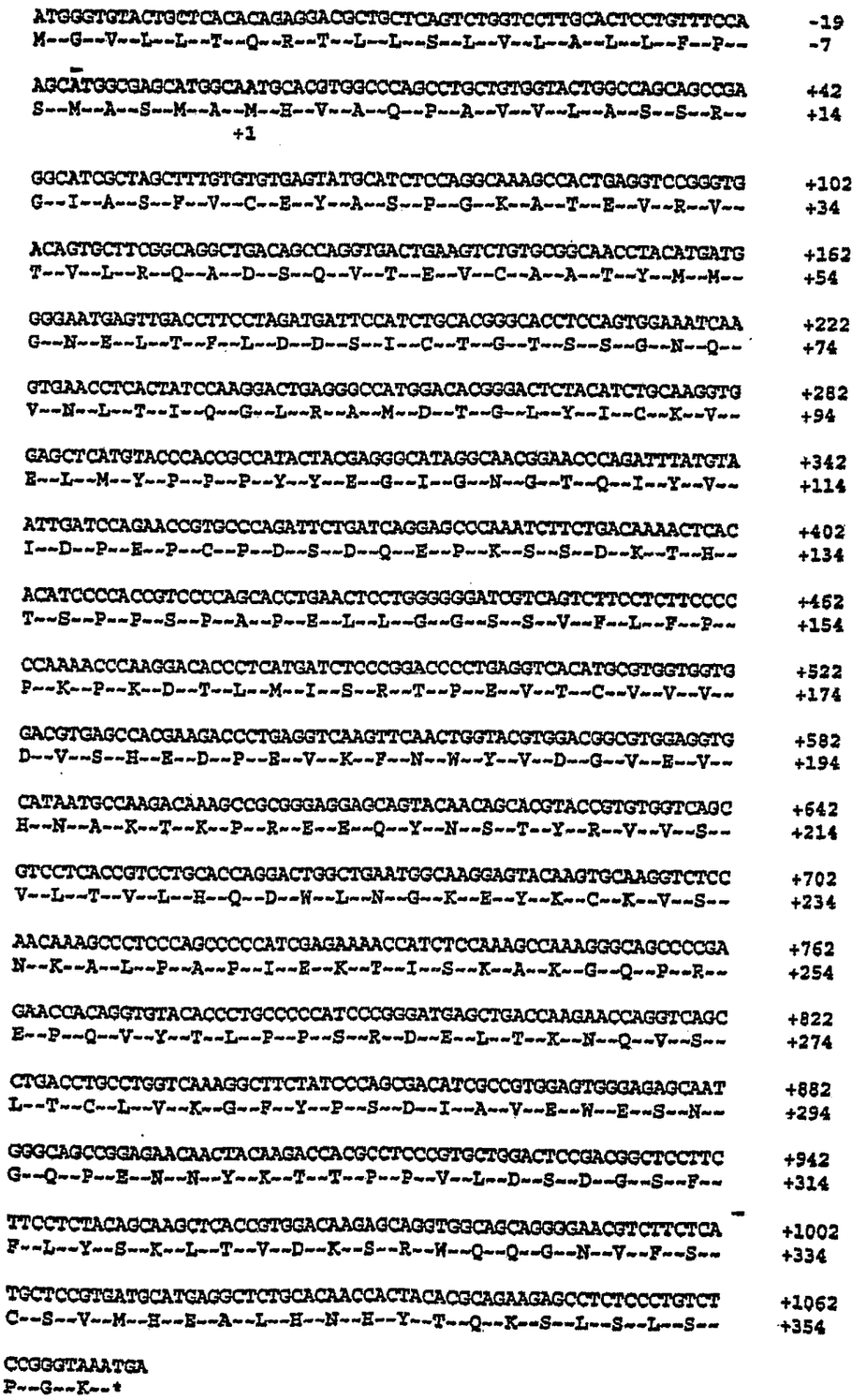

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P-- -7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R-- +14
+1
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V-- +34
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M-- +54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q-- +74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V-- +94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA +342
E--L--M--Y--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V-- +114
ATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H-- +134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P-- +154
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V-- +174
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V-- +194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S-- +214
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S-- +234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R-- +254
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S-- +274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N-- +294
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F-- +314
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S-- +334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S-- +354
CCGGGTAAATGA
P--G--K--*

FIG. 10A

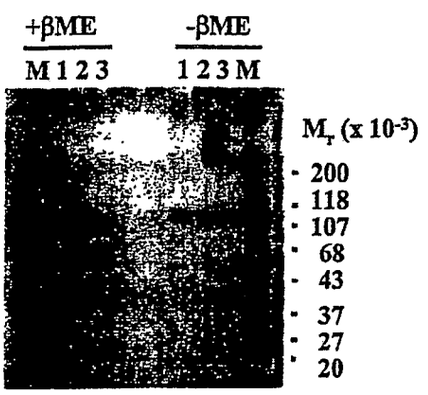


FIG. 10B

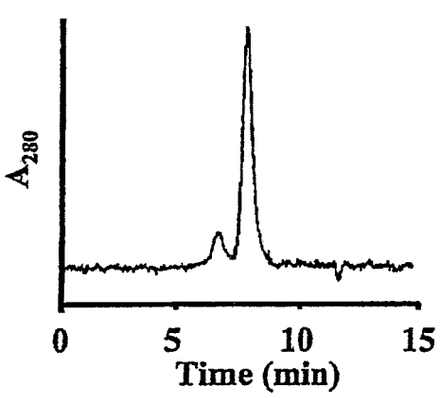


FIG. 10C

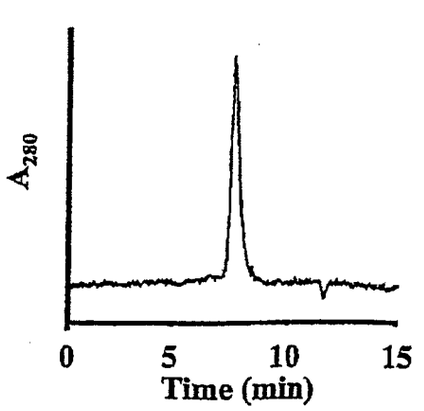




FIG. 11

FIG. 12

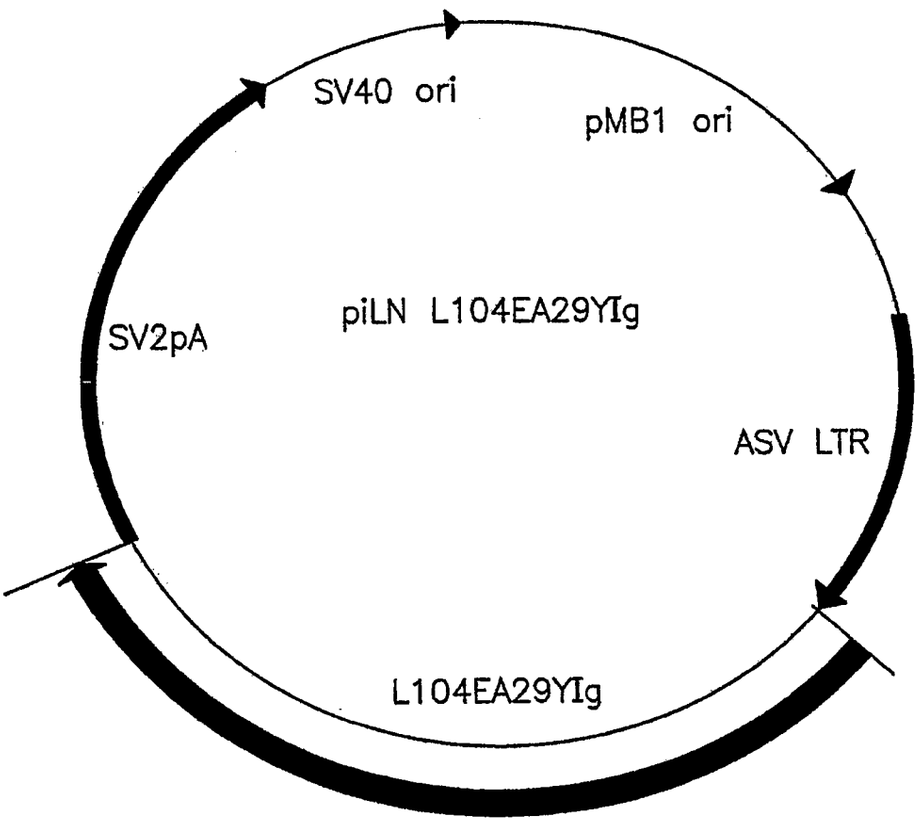
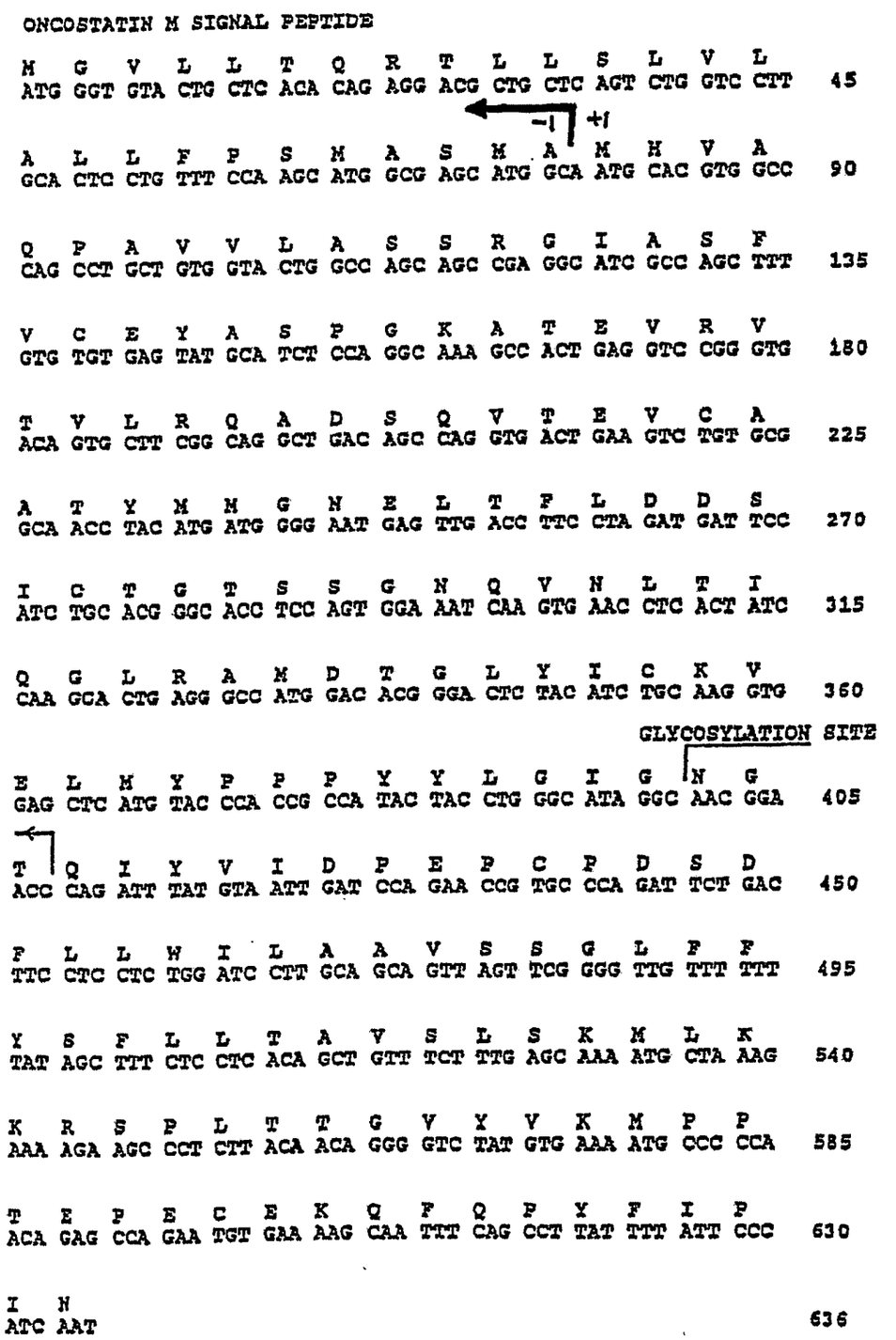

SV40 ori
pMB1 ori
piLN L104EA29YIg
SV2pA
ASV LTR
L104EA29YIg

FIG. 13


ONCOSTATIN M SIGNAL PEPTIDE
M G V L L T Q R T L L S L V L
ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG CTC AGT CTG GTC CTT 45
-1 +1
A L L F P S M A S M A M H V A
GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC 90
Q P A V V L A S S R G I A S F
CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT 135
V C E Y A S P G K A T E V R V
GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG 180
T V L R Q A D S Q V T E V C A
ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG 225
A T Y M M G N E L T F L D D S
GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC 270
I C T G T S S G N Q V N L T I
ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG AAC CTC ACT ATC 315
Q G L R A M D T G L Y I C K V
CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTC TAC ATC TGC AAG GTG 360
GLYCOSYLATION SITE
E L M Y P P P Y Y L G I G N G
GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA 405
T Q I Y V I D P E P C P D S D
ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC 450
F L L W I L A A V S S G L F F
TTC CTC CTC TGG ATC CTT GCA GCA GTT AGT TCG GGG TTG TTT TTT 495
Y S F L L T A V S L S K M L K
TAT AGC TTT CTC CTC ACA GCT GTT TCT TTG AGC AAA ATG CTA AAG 540
K R S P L T T G V Y V K M P P
AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT GTG AAA ATG CCC CCA 585
T E P E C E K Q F Q P Y F I P
ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCC 630
I N
ATC AAT 636

SEQUENCE LISTING

<110> Bristol-Myers Squibb Company
Hagerty, David
Rusnak, James

<120> METHODS FOR TREATING IMMUNE DISORDERS ASSOCIATED WITH GRAFT TRANSPLANTATION WITH SOLUBLE CTLA4 MUTANT MOLECULES

<130> 10522 PSP

<160> 10

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oncostatin M CTLA4 (OMCTLA4) Forward Primer

<400> 1
gaggtgataa agcttcacca atgggtgtac tgctcacaca g 41

<210> 2
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oncostatin M CTLA4 (OMCTLA4) Reverse Primer

<400> 2
gtggtgtatt ggtctagatc aatcagaatc tgggcacggt tc 42

<210> 3
<211> 1152
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L104EA29YIg

<400> 3
atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcact cctgtttcca 60

agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggtactggc cagcagccga 120

ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aatatactga ggtccgggtg 180

acagtgcttc ggcaggctga cagccaggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240

gggaatgagt tgaccttcct agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300

gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaaggtg 360

gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaaccca gatttatgta 420

attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480

acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 540

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140

ccgggtaaat ga 1152

<210> 4
<211> 383
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L104EA29YIg

<400> 4

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 5
<211> 1152
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L104EIg

<400> 5
atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcact cctgtttcca 60

agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggtactggc cagcagccga 120

ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg 180

acagtgcttc ggcaggctga cagccaggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240

gggaatgagt tgaccttcct agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300

gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaaggtg 360

gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaaccca gatttatgta 420

attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480

acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 540

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140

ccgggtaaat ga 1152

<210> 6
<211> 383
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L104EIg

<400> 6

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 7
<211> 1152
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CTLA4Ig

<400> 7
atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcact cctgtttcca 60

agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggtactggc cagcagccga 120

ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg 180

acagtgcttc ggcaggctga cagccaggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240

gggaatgagt tgaccttcct agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300

gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaaggtg 360

gagctcatgt acccaccgcc atactacctg ggcataggca acggaaccca gatttatgta 420

attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480

acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggtggat cgtcagtctt cctcttcccc 540

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 720

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140

ccgggtaaat ga 1152

<210> 8
<211> 383
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CTLA4Ig

<400> 8

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 9
<211> 636
<212> DNA
<213> Homo Sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(636)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (79)..()

<400> 9

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca      48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct      96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag     144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg     192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg     240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc     288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac     336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac     384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa     432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gac ttc ctc ctc tgg atc ctt gca gca gtt agt     480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
    120                 125                 130

tcg ggg ttg ttt ttt tat agc ttt ctc ctc aca gct gtt tct ttg agc     528
Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
135                 140                 145                 150

aaa atg cta aag aaa aga agc cct ctt aca aca ggg gtc tat gtg aaa     576
Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
                155                 160                 165
```

```
atg ccc cca aca gag cca gaa tgt gaa aag caa ttt cag cct tat ttt      624
Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
            170                 175                 180

att ccc atc aat                                                      636
Ile Pro Ile Asn
        185
```

<210> 10
<211> 212
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 10

```
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5              -1  1               5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
    120                 125                 130

Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
```

135 140 145 150

Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
155 160 165

Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
170 175 180

Ile Pro Ile Asn
185

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA BAJO EL TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

00135

(19)Organizacion Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de publicación internacional
12 Octubre 2006 (12.10..06)

PCT

(10) Número de publicación internacional:
WO 2006/108035 A1

(51) Clasificación de patente internacional[7]:
A61K 38/17 (2006.01)

(21) Número de solicitud internacional: PCT/US2006/012648

(22) Fecha de presentación internacional:
5 Abril 2006 (05.04.2006)

(25) Lenguaje de presentación: Inglés

(26) Lenguaje de publicación: Inglés

(30) Datos de prioridad:
60/668,774 6 Abril 2005 (06.04.2005) US

(71) Solicitante (para todos los paises designados excepto EU): **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY** [US/US]; Route 206 and Province Line Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(72) Inventores; y
(75) Inventores/Solicitantes (para EU solamente): **HAGERTY, David** [US/US]; 3 Nobadeer Drive, Pennington, New Jersey 08534 (US). **RUSNAK, James** [US/US]; 640 Pineville Road, Newtown, Pennsylvania 18940 (US).

(74) Agente: **PARLET, Nickki** et al.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

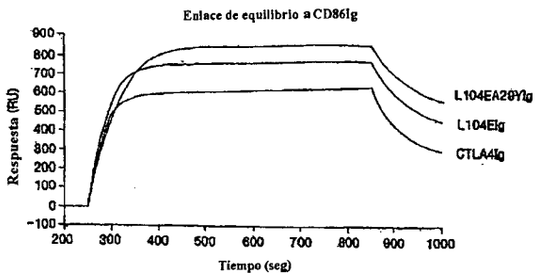
(81) Estados designados (Nacional):
AE,AG,AL,AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (Regional): Patente ARIPO (GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW) Patente Euroasiatica (AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM) Patente Europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR ,IE, IT, LU, MC, NL, PT ,SE, TR) Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada
Con el reporte de busqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaciones. Referirse a "Guía de Notas para códigos y abreviaciones" que aparece al inicio de cada tema regular en la Gaceta PCT.

(54) Título: METODOS PARA TRATAMIENTO DE TRASTORNOS INMUNES ASOCIADOS CON TRASPLANTE DE INJERTO CON MOLECULAS MUTANTES CTLA4 SOLUBLES



(57) Extracto: La presente invención proporciona el uso de moléculas mutantes de CTLA4 solubles que se aglutinan con mayor afinidad hacia el antígeno de CD80 y/o CD86 que el CTLA4 del tipo silvestre o el CTLA4Ig no mutado en el tratamiento de trastornos inmune asociados con el trasplante de injerto.

METODOS PARA TRATAMIENTO DE TRASTORNOS INMUNES ASOCIADOS CON TRASPLANTE DE INJERTO CON MOLECULAS MUTANTES CTLA4 SOLUBLES

Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de moléculas mutantes de CTLA4 solubles, con afinidad de aglutinación incrementada hacia CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) comparado con CTLA4 del tipo silvestre, en el tratamiento de trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto.

Antecedentes de la invención

Dado el papel central de las células T en el rechazo de trasplantes, una meta común entre las terapias inmunosupresivas comunes es bloquear la función y activación de las células T (Sayegh MH, Turka LA. The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. N. Engl. J. Med. 1998;338(25):1813-21). Las células T requieren tanto una señal específica del antígeno (señal 1) como una señal co-estimuladora (señal 2) para la activación completa (Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. Annu Rev Immunol 1996; 14:233-58). Una de las rutas co-estimuladoras mejor caracterizadas involucra la interacción de CD28-CD80/86 (B7-1/2) (Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. Annu Rev Immunol 1993;11:191-212). El antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA4) se aglutina a CD80/86 con una

afinidad más elevada que a CD28, y es expresado transitoriamente sobre las células T después de su activación, en donde el mismo interrumpe la interacción entre CD28 y CD80/86 (Oosterwegel MA, Greenwald RJ, Mandelbrot DA, Lorsbach RB, Sharpe AH. CTLA4 and T cell activation. Curr Opin Immunol 1999;11(3):294-300). Esto crea una señal de retroalimentación negativa para la activación de las células T.

La intervención en esta ruta ha sido buscada previamente con CTLA4Ig. El CTLA4Ig ha sido utilizado exitosamente como una estrategia para tratar los trastornos autoinmunes mediados por las células T, tales como la artritis reumatoide (Kremer JM, Westhovens R, Leon M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. N Engl J Med 2003;349(20):1907-15) y psoriasis (Abrams JR, Lebwohl MG, Guzzo CA, et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. J Clin Invest 1999; 103 (9): 1243-52).

El LEA29Y ha sido estudiado en modelos de trasplante de primate no humano solo y en combinación con otros agentes inmunosupresores. Christian Larsen et al (C. Larsen, T. Pearson, A. Adams, P. Tso, N. Shirasugi, E. Strobert, D. Anderson, S. Cowan, K. Price, J. Naeruma, J. Emswiler, J. Greene, L.A. Turk, J. Bajorath, R. Townsend, D. Hagerty, P.

Linsley y R. Peach; Rational Development Of LEA29Y (belatacept), a High-Affinity Variant of CTLA4-Ig with Potent Immunosuppressive Properties; American Journal of Transplantation; Vol. 5, expedida el 3 de marzo del 2005, p. 443) han mostrado la actividad inmunosupresora mejorada de LEA29Y cuando se compara con CTLA4-Ig en un modelo de primate no humano utilizado para estudiar el rechazo del aloinjerto renal. El LEA29Y fue administrado intra-operativamente (10 mg/kg intravenosamente), el día 4 (15 mg/kg) y en los días post-operativos 14, 28, 42, 56 y 70 (20 mg/kg intravenosamente). El CTLA4Ig (16 mg/kg) fue administrado intra-operativamente y en los días post-operativos 4, 8, 11 y 16. El régimen de tratamiento también incluyó MMF (15 mg/kg dado s.c. en los días 0-14, diariamente en los días 15-180), metilprednisolona (inyección subcutánea de acuerdo con el siguiente programa, día 0: 20 mg, día 1: 16 mg, día 3: 8 mg, día 4: 4 mg, días 5-14: 3 mg, días 15-180: 1 mg) y basiliximab (0.3 mg/kg i.v. los días 0 y 4). La supervivencia de los receptores del aloinjerto renal tratados con LEA29Y fue claramente superior a aquella de un grupo tratado con CTLA4-Ig a pesar de las concentraciones comparables en el suero. Los receptores de control tratados con la albúmina mostraron un tiempo de supervivencia promedio semejante al grupo tratado con CTLA4-Ig. Sin embargo, a pesar del tratamiento en curso con LEA29Y, todos los receptores

experimentaron una declinación significativa en la función renal (elevación en la creatinina del suero).

Andrew Adams et al (A. Adams, N. Shirasugi, T. Jones, M. Durham, E. Strobert, S. Cowan, P. Rees, R. Hendrix, K. Price, N. Kenyon, D. Hagerty, R. Townsend, D. Hollenbaugh, T. Pearson y C. Larsen; Development of a Chimeric Anti-CD40 Monoclonal Antibody That Synergizes with LEA29Y to Prolong Islet Allograft Survival; The Journal of Immunology; enero del 2005; 174; p. 542) han mostrado que la combinación de LEA29Y y Chi220 (un CD40 mab anti-humano, quimérico) actúa sinergísticamente en un modelo de primate no humano de trasplante de los islotes pancreáticos para prolongar la supervivencia del aloinjerto. El LEA29Y fue administrado intravenosamente, intra-operativamente (20 mg/kg); en los días post-operativos 4, 7 y 14; luego cada dos semanas hasta el día 100. Las dosis adicionales (20 mg/kg) fueron administradas mensualmente hasta 6 meses. Cuatro protocolos fueron probados: 1) LEA29Y solo, 2) Chi220 (anti-CD40), 3) LEA29Y combinado con Chi220, y 4) LEA29Y combinado con anti-CD20.

Andrew Adams et al (A. Adams, N. Shirasugi, M. Durham, E. Strobert, D. Anderson, P. Rees, S. Cowan, H. Xu, Y. Blinder, M. Cheung, D. Hollenbaugh, N. Kenyon, T. Pearson y C. Larsen; Calcineurin Inhibitor-Free CD28 Blockade-Based Protocol Protects Allogeneic Islets in Nonhuman Primates;

Diabetes, Vol. 51(2), febrero del 2002, p. 265) han mostrado que la combinación de LEA29Y, rapamicina, y anti-IL2R mAb prolongó significativamente la supervivencia del aloinjerto de los islotes en un modelo de primate no humano del trasplante de islotes pancreáticos. El LEA29Y fue administrado intravenosamente, intra-operativamente (10 mg/kg) y en el día post-operativo 4 (15 mg/kg). Se proporcionaron dosis adicionales de 20 mg/kg en el día post-operativo 14 y cada 2 semanas hasta el día post-operativo 154.

Durante el 2003, más de 25,000 órganos fueron trasplantados en los Estados Unidos de América. El trasplante de riñón representó aproximadamente 60 % de los trasplantes de órganos sólidos seguido por trasplantes de hígado en 21 %, corazón en 8 %, pulmón en 4 % y el restante 7 % representado por otros trasplantes de órganos tales como el páncreas e intestino. (OPTN/SRTR Annual Report 2004 en www.optn.org).

El trasplante renal es el tratamiento más efectivo para la enfermedad renal en la etapa final. EL mismo proporciona una supervivencia y calidad de vida mejoradas (QoL). El mantenimiento de un trasplante renal funcionando exige una terapia inmunosupresora de por vida para prevenir la destrucción inmune del injerto. Los regímenes inmunosupresores actuales proporcionan tasas de supervivencia de 1 año del 89 % para injertos de cadáveres y del 94 % para

injertos de donadores vivos. Durante el transcurso del tiempo, sin embargo, existe una pérdida progresiva tanto de los sujetos como de los injertos. Cinco años de supervivencia para los trasplantes renales de cadáveres y de donadores relacionados vivos es del 66 % y 79 %, respectivamente. (United Network for Organ Sharing Renal Transplant Registry 2003 en www.unos.org).

Las causas más comunes de pérdidas de sujetos y de injertos a largo plazo son las enfermedades cardiovasculares y la nefropatía de aloinjerto crónico (CAN por sus siglas en inglés), respectivamente, (L. C. Paul, Chronic allograft nephropathy- A model of impaired repair rom injury? Nephrol Dial Transplant 2000; 15: 149-151). Paradójicamente, las terapias principales para el trasplante renal, los inhibidores de calcineurina (CNIs), CsA y tacrolimus, contribuyen directamente a la pérdida del aloinjerto a largo plazo y a la muerte del sujeto, puesto que los mismos son inherentemente nefrotóxicos, y también provocan o agravan los riesgos cardiovasculares, incluyendo hipertensión, hipercolesterolemia, y diabetes mellitus. Sin embargo, estos agentes forman la piedra angular de todos los regímenes inmunosupresores convencionales para el trasplante renal.

En el presente, no existen agentes aprobados que puedan reemplazar CNIs como una terapia inmunosupresora de

mantenimiento de piedra angular, en una gama amplia de sujetos. Un agente, el sirolimus (Rapamune® de Wyeth/Ayerst), ha sido aprobado para su uso en un régimen de suplemento de CNI. Los CNIs, sin embargo, todavía deben ser utilizados con sirolimus durante al menos 3 meses post-trasplante. De manera más importante, el sirolimus ha sido aprobado como un agente de suplemento de CNI en este medio ambiente solamente para sujetos en riesgo bajo a moderado de pérdida de injerto. Por consiguiente, para aquellos en riesgo más elevado de pérdida del injerto, en quienes evitar los efectos nefrotóxicos de CNIs podría ser de un gran beneficio, no existe alternativa aprobada para CNIs.

Por lo tanto, existe una necesidad médica no satisfecha de agentes inmunosupresores que pueden proporcionar el control aceptable de la respuesta aloinmunes comparable con el estándar de las terapias prácticas sin toxicidades que contribuyan a la muerte del sujeto y a la pérdida del injerto a largo plazo. Idealmente, el agente podría ser útil no solamente en sujetos en riesgo bajo, sino también en sujetos en riesgo más elevado de pérdida del injerto.

Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona métodos para tratar los trastornos inmunes asociados con el trasplante de injertos por la administración de moléculas mutantes de CTLA4

que se aglutinan con una gran afinidad hacia el antígeno de CD80 y/o CD86 que al CTLA4 del tipo silvestre o CTLA4-Ig no mutado. Las moléculas de CTLA4 tienen una primera secuencia de aminoácidos que comprende el dominio extracelular de CTLA4, en donde ciertos residuos de aminoácidos dentro de la región S25-R33 y la región M97-G107 están mutados. Las moléculas mutantes de la invención también pueden incluir una segunda secuencia de aminoácidos que incremente la solubilidad de la molécula mutante.

Un ejemplo de una molécula mutante de CTLA4 es L104EA29YIg (Figura 7, SEC ID NOS: 3 y 4), como se describió aquí. Otro ejemplo de una molécula mutante de CTLA4 es L104EIg (Figura 8, SEC ID NOS: 5 y 6), como se describió aquí. El L104EA29YIg y L104EIg se aglutinan a CD80 y CD86 con más afinidad que CTLA4Ig.

La administración de las moléculas mutantes de CTLA4 de la invención puede ser efectuada durante varios intervalos de tiempo. Típicamente, los regímenes de administración incluyeron una fase inicial, en la cual las dosis son más elevadas y la frecuencia de administración es incrementada durante el período de riesgo inmunológico más grande, seguido por una fase de mantenimiento. La fase inicial puede variar desde los primeros 3 a 6 meses post-trasplante. El régimen de administración durante la fase inicial puede variar dependiendo del estado del receptor/injerto.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno inmune asociado con el trasplante de injertos por la administración a un sujeto de una dosis efectiva de una molécula mutante de CTLA4 con un dominio extracelular de CTLA4 como se muestra en la SEC ID NO: 8 empezando con la alanina en la posición 26 o metionina en la posición 27, y finalizando con el ácido aspártico en la posición 150, o una porción del mismo. Adicionalmente, en el dominio extracelular o una porción del mismo, una alanina en la posición 55 es substituida con una tirosina, y una leucina en la posición 130 es substituida con un ácido glutámico. Además, el régimen de administración comprende un régimen de fase inicial, en donde el régimen de fase inicial puede variar desde los primeros 3 a 6 meses post-trasplante e involucra la administración que inicialmente es más frecuente que cada mes.

En otra modalidad, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno inmune asociado con el trasplante de injerto, por la administración a un sujeto de una dosis efectiva de una molécula mutante de CTLA4 con una secuencia de aminoácidos que empieza con la metionina en la posición 27 y que finaliza con el ácido aspártico en la posición 150 de la SEC ID NO: 4, o con una secuencia de aminoácidos que empieza con la alanina en la posición 26 y que finaliza con el ácido aspártico en la posición 150 de la

SEC ID NO: 4. Además, el régimen de administración de la molécula mutante de CTLA4 comprende un régimen de fase inicial, en donde el régimen de fase inicial puede variar desde los primeros 3 a 6 meses post-trasplante e involucra la administración que inicialmente es más frecuente que mensualmente.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el análisis de aglutinación en el equilibrio de L104EA29YIg, L104EIg, y el CTLA4Ig del tipo silvestre a CD86Ig.

La figura 2A y la figura 2B ilustran datos de los ensayos de FACS que muestran la aglutinación de L104EA29YIg, L104EIg, y CTLA4Ig a las células humanas de CHO transfectadas con CD80 o CD86 como se describe en el ejemplo 2, infra.

La figura 3A y la figura 3B muestran la inhibición de la proliferación de las células de CHO positivas a CD80 y positivas a CD86 como se describe en el ejemplo 2, infra.

La figura 4A y la figura 4B muestran que L104EA29YIg es más efectivo que CTLA4Ig en la inhibición de la proliferación de las células T aloestimuladas primarias y secundarias, como se describe en el ejemplo 2, infra.

La figura 5A, la figura 5B, y la figura 5C ilustran que L104EA29YIg es más efectivo que CTLA4Ig en la inhibición de IL-2 (figura 5A), IL-4 (figura 5B), y γ-interferón (figura 5C) de la producción de citosinas de las células T humanas

aloestimuladas, como se describe en el ejemplo 2, infra.

La figura 6 demuestra que L104EA29YIg es más efectivo que CTLA4Ig en la inhibición de la proliferación de células T de mono, estimuladas con fitohemaglutinina (PHA), como se describe en el ejemplo 2, infra.

La figura 7 (SEC ID NOS: 3 y 4) muestra una secuencia de nucleótidos y aminoácidos de una molécula mutante de CTLA4 ("L104EA29YIg") que comprende un péptido de la señal; un dominio extracelular mutado de CTLA4 iniciando en la metionina en la posición +1 y finalizando en la posición del ácido aspártico +124, o empezando en la alanina en la posición -1 y finalizando en el ácido aspártico en la posición +124; y una región de Ig como se describe en el ejemplo 1, infra. Las SEC ID NOS: 3 y 4 muestran una secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de una molécula mutante de CTLA4 ("L104EA29YIg") que comprende un péptido de la señal; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que empieza en la metionina en la posición +27 y que finaliza en el ácido aspártico en la posición +150, o empezando en la alanina en la posición +26 y finalizando en el ácido aspártico en la posición +150; y una región de Ig.

La figura 8 (SEC ID NOS: 5 y 6) muestra una secuencia de nucleótidos y aminoácidos de una molécula mutante de CTLA4 ("L104EIg") que comprende un péptido de la señal; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que inicia en la metionina en la

posición +1 y que finaliza en el ácido aspártico en la posición +124, o que inicia en la alanina en la posición -1 y que finaliza en el ácido aspártico en la posición +124; y una región de Ig, como se describe en el ejemplo 1, infra. Las SEC ID NOS: 5 y 6 muestran una secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de una molécula mutante de CTLA4 ("L104EIg") que comprende un péptido de la señal; un dominio extracelular mutado de CTLA4 que empieza en la metionina en la posición +27 y que finaliza en el ácido aspártico en la posición +150, o que empieza en la alanina en la posición +26 y que finaliza en el ácido aspártico en la posición +150; y una región de Ig.

La figura 9 (SEC ID NOS: 7 y 8) muestra una secuencia de nucleótidos y aminoácidos de un CTLA4Ig que tiene un péptido de la señal; una secuencia de aminoácidos del tipo silvestre del domino extracelular de CTLA4 que empieza en la metionina en la posición +1 hasta el ácido aspártico en la posición +124, o empezando en la alanina en la posición -1 hasta el ácido aspártico en la posición +124; y una región de Ig. Las SEC ID NOS: 7 y 8 muestran una secuencia de nucleótidos y aminoácidos, respectivamente, de un CTLA4Ig que comprende un péptido de la señal; una secuencia de aminoácidos del tipo silvestre del dominio extracelular de CTLA4 que empieza en la metionina en la posición +27 y que finaliza en el ácido aspártico en la posición +150, o que empieza en la alanina en

la posición +26 y que finaliza en el ácido aspártico en la posición +150; y una región de Ig.

La figura 10A, la figura 10B, y la figura 10C son un gel de SDS (figura 10A) para CTLA4Ig (banda 1), L104EIg (banda 2), y L104EA29YIg (banda 3A); y cromatografías por exclusión de tamaño de CTLA4Ig (figura 10B) y L104EA29YIg (figura 10C).

La figura 11 ilustra un diagrama en forma de cinta de pliegue semejante a una V, del Ig extracelular de CTLA4, generado a partir de la estructura de la solución determinada por espectroscopía de RMN. La figura 11B muestra una vista expandida de la región S25-R33 y de la región MYPPPY que indican la localización y orientación de la cadena lateral de las mutaciones mejoradoras de la afinidad, L104 y A29.

La figura 12 muestra un diagrama esquemático de un vector, piLN-L104EA29Y, que tiene el inserto de L104EA29YIg.

La figura 13 muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del receptor de CTLA4 (SEC ID NOS: 9 y10).

Descripción detallada de la invención

DEFINICIONES

Todos los términos científicos y técnicos utilizados en esta solicitud tienen los significados utilizados comúnmente en el arte a menos que se especifique de otra manera. Cuando se utilicen en esta solicitud, las siguiente palabras o frases tienen los significados especificados.

Cuando se utilice aquí, "ligando" se refiere a una

molécula que reconoce específicamente y se aglutina a otra molécula, por ejemplo, un ligando de CTLA4 es una molécula de B7.

Cuando se utilice aquí, "CTLA4 del tipo silvestre" o "CTLA4 no mutado" tiene la secuencia de aminoácidos del CTLA4 de longitud completa, que está presente naturalmente, como se muestra en la figura 13 (SEC ID NOS: 9 y 10; también como se describe en las patentes U.S. Nos. 5,434,131, 5,844,095, 5,851,795), o cualquier porción o derivado del mismo, que reconoce y se aglutina a B7 o interfiere con B7 de modo que el mismo bloquee la aglutinación a CD28 y/o CTLA4 (por ejemplo, CD28 y/o CTLA4 endógenos). En las modalidades particulares, el dominio extracelular de CTLA4 del tipo silvestre empieza con la metionina en la posición +1 y finaliza en el ácido aspártico en la posición +124, o el dominio extracelular del CTLA4 del tipo silvestre empieza con la alanina en la posición -1 y finaliza en el ácido aspártico en la posición +124. El CTLA4 del tipo silvestre, es una proteína de la superficie de la célula, que tiene un dominio extracelular N-terminal, un domino de la transmembrana, y un dominio citoplásmico C-terminal. El dominio extracelular se aglutina a las moléculas objetivo, tales como una molécula de B7. En una célula, la proteína de CTLA4 del tipo silvestre, que está presente naturalmente, es traducida como un polipéptido inmaduro, el cual incluye un péptido de la señal

en el extremo N-terminal. El polipéptido inmaduro padece el procesamiento post-traduccional, el cual incluye la segmentación y la remoción del péptido de la señal para generar un producto de la segmentación de CTLA4 que tiene un extremo N-terminal generado recientemente, que difiere del extremo N-terminal en la forma inmadura. Un experto en el arte apreciará que puede ocurrir el procesamiento post-traduccional, adicional, que remueve uno o más de los aminoácidos del extremo N-terminal generado recientemente del producto de segmentación de CTLA4. Alternativamente, el péptido de la señal no puede ser removido completamente, generando moléculas que empiezan antes de la metionina del aminoácido de partida común. Por consiguiente, la proteína de CTLA4 madura puede empezar en la metionina en la posición +1 o la alanina en la posición -1. La forma madura de la molécula de CTLA4 incluye el dominio extracelular o cualquier porción de la misma, que se aglutina a B7.

"CTLA4Ig" es una proteína de fusión soluble que comprende un domino extracelular de CTLA4 del tipo silvestre unido a una extremidad de Ig, o una porción de la misma que se aglutina a B7. Una modalidad particular comprende el dominio extracelular de CTLA4 del tipo silvestre (como se muestra en la figura 9, SEC ID NOS: 7 y 8) que empieza en la metionina en la posición +1 y que finaliza en el ácido aspártico en la posición +124; o que empieza en la alanina en

la posición -1 hasta el ácido aspártico en la posición +124; una glutamina del residuo de aminoácido de unión en la posición +125; y una porción de inmunoglobulina que abarca el ácido glutámico en la posición +126 hasta la lisina en la posición +357 (el ADN que codifica CTLA4Ig fue depositado el 31 de mayo de 1991 ante el American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 bajo las provisiones del tratado de Budapest, y se ha acordado el número de acceso del ATCC que es ATCC 68629; Linsey, P., et al., 1994 Immunity 1:793-80. El CTLA4Ig-24, una línea celular de los ovarios del hámster chino (CHO) que expresa CTLA4Ig, fue depositado el 31 de mayo de 1991 con el número de identificación ATCC CLR-10762). Las moléculas de CTLA4Ig solubles pueden incluir o no, una secuencia del péptido de la señal (delantero).

Cuando se utilice aquí, una "proteína de fusión" está definida como una o más secuencias de aminoácidos unidas conjuntamente utilizando los métodos bien conocidos en el arte y como se describe en las patentes US No. 5,434,131 ó 5,637,481. Las secuencias de aminoácidos unidas forman, por medio de esto, una proteína de fusión.

Cuando se utilice aquí, "soluble" se refiere a cualquier molécula, o fragmentos y derivados de la misma, no unidos o fijados a una célula, es decir, circulantes. Por ejemplo, CTLA4, B7 o CD28 se pueden hacer solubles por la fijación de

una porción de inmunoglobulina (Ig) al dominio extracelular de CTLA4, B7 o CD28, respectivamente. De manera alternativa, una molécula tal como CTLA4 se puede volver soluble, removiendo su dominio de la transmembrana.

Cuando se utilice aquí, "el dominio extracelular de CTLA4" es la porción de CTLA4 que reconoce y se aglutina a los ligandos de CTLA4, tales como las moléculas de B7. Por ejemplo, un domino extracelular de CTLA4 comprende la metionina en la posición +1 hasta el ácido aspártico en la posición +124 (figura 13, SEC ID NOS: 9 y 10). Alternativamente, un dominio extracelular de CTLA4 comprende la alanina en la posición -1 hasta el ácido aspártico en la posición +124 (figura 13, SEC ID NOS: 9 y 10). El dominio extracelular incluye fragmentos o derivados de CTLA4 que se aglutinan a una molécula de B7. El dominio extracelular de CTLA4, como es mostrado en la figura 13 (SEC ID NOS: 9 y 10), también puede incluir mutaciones que cambian la afinidad de aglutinación de la molécula de CTLA4 hacia una molécula de B7.

Cuando se utilice aquí, una "molécula mutante de CTLA4" significa CTLA4 del tipo silvestre como se muestra en (SEC ID NOS: 9 y 10), o cualquier porción o derivado del mismo, que tiene una mutación o mutaciones múltiples (preferentemente en el dominio extracelular del CTLA4 del tipo silvestre). Una

molécula mutante de CTLA4 tiene una secuencia que es semejante, pero no idéntica, a la secuencia de la molécula de CTLA4 del tipo silvestre, pero todavía se aglutina a B7. Las mutaciones pueden incluir uno o más residuos de aminoácidos substituidos con un aminoácido que tiene una estructura conservadora (por ejemplo, substituyendo una leucina con una isoleucina) o no conservadora (por ejemplo, substituyendo una glicina con un triptófano) o propiedades químicas, deleciones de aminoácidos, adiciones, cambios de estructura, o cortes. Las moléculas mutantes de CTLA4 pueden incluir una molécula diferente de CTLA4 en las mismas o fijada a las mismas. Las moléculas mutantes pueden ser solubles (es decir, circulantes) o unidas a una superficie celular. Las moléculas mutantes de CTLA4 adicionales incluyen aquellas descritas en las solicitudes de patente U.S. Números de serie 09/865,321, 60/214,065 y 60/287,576; en las patentes U.S. números 6,090,914, 5,844,095 y 5,773,253; y como se describió por Peach, R. J., et al., en J Exp Med 180: 2049-2058 (1994). Las moléculas mutantes de CTLA4 se pueden hacer de manera sintética o recombinante.

"L104EA29YIg" es una proteína de fusión que es

una molécula mutante de CTLA4, soluble, que comprende un dominio extracelular del CTLA4 del tipo silvestre con los cambios de aminoácidos A29Y (un residuo de aminoácido de tirosina que se substituye por una alanina en la posición 29), y L104E (un residuo de aminoácido de ácido glutámico que se substituye por una leucina en la posición +104), o una porción del mismo que se aglutina a la molécula de B7, unida a una extremidad de Ig (incluida en la figura 7, SEC ID NOS: 3 y 4; el ADN que codifica L104EA29YIg fue depositado el 20 de junio del 2000 con el número del ATCC, PTA-2104; copendiente en las solicitudes de patente U.S. números de serie 09/579,927, 60/287,576 y 60/214,065, incorporadas aquí para referencia). Las moléculas de L104EA29YIg solubles utilizadas en los métodos y/o los kits de la invención, pueden incluir o no una secuencia del péptido de la señal (delantero). Típicamente, en los métodos y/o los kits de la invención, las moléculas no incluyen una secuencia del péptido de la señal.

Cuando se utilice aquí, el término "mutación" significa un cambio en la secuencia del nucleótido o aminoácido de una molécula del tipo silvestre, por ejemplo, un cambio en las secuencias de ADN y/o aminoácidos del dominio extracelular de CTLA4 del

tipo silvestre. Una mutación en el ADN puede cambiar un codón que conduce a un cambio en la secuencia de aminoácidos. Un cambio del ADN puede incluir substituciones, deleciones, inserciones, empalme alternativo, o cortes. Un cambio de aminoácido puede incluir substituciones, deleciones, inserciones, adiciones, cortes, o errores de segmentación o procesamiento de la proteína. Alternativamente, las mutaciones en una secuencia de nucleótidos pueden conducir a una mutación inmóvil en la secuencia de aminoácidos como será bien entendido en el arte. A este respecto, ciertos codones del nucleótido codifican el mismo aminoácido. Los ejemplos incluyen los codones de nucleótidos CGU, CGG, CGC, y CGA que codifican el aminoácido, la arginina (R); o los codones GAU, y GAC que codifican el aminoácido, el ácido aspártico (D). Por consiguiente, una proteína puede ser codificada por una o más moléculas de ácido nucléico que difieren en su secuencia de nucleótidos específicos, pero que todavía codifican las moléculas de la proteína que tienen secuencias idénticas. La secuencia de codificación del aminoácido es como sigue:

Aminoácido	Símbolo	Símbolo de una letra	Codones
Alanina	Ala	A	GCU, GCC, GCA, GCG
Cisteína	Cys	C	UGU, UGC
Ácido Aspártico	Asp	D	GAU, GAC

Aminoácido	Símbolo	Símbolo de una letra	Codones
Ácido glutámico	Glu	E	GAA, GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUU, UUC
Glicina	Gly	G	GGU, GGC, GGA, GGG
Histidina	His	H	CAU, CAC
Isoleucina	Ile	I	AUU, AUC, AUA
Lisina	Lys	K	AAA, AAG
Leucina	Leu	L	UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAU, AAC
Prolina	Pro	P	CCU, CCC, CCA, CCG
Glutamina	Gln	Q	CAA, CAG
Arginina	Arg	R	CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
Serina	Ser	S	UCU, UCC, UCA, UCG, AGU, AGC
Treonina	Thr	T	ACU, ACC, ACA, ACG
Valina	Val	V	GUU, GUC, GUA, GUG
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAU, UAC

La molécula mutante puede tener una o más mutaciones.

Cuando se utilice aquí, una "secuencia de proteína diferente de CTLA4" o "molécula diferente de CTLA4", significa cualquier molécula de proteína que no se aglutina a B7 y que no interfiere con la aglutinación de CTLA4 a su

objetivo. Un ejemplo incluye, pero no está limitado a, una región constante de inmunoglobulina (Ig) o una porción de la misma. Preferentemente, la región constante de Ig es una región constante de Ig del mono o de un ser humano, por ejemplo, la C(gamma)1 humana, incluyendo las regiones de unión, de CH2 y CH3. La región constante de Ig puede ser mutada para reducir sus funciones efectoras (patentes U.S. 5,637,481, 5,844,095 y 5,434,131).

Cuando se utilice aquí, un "fragmento" o "porción" es cualquier parte o segmento de una molécula de CTLA4, preferentemente el dominio extracelular de CTLA4 o una parte o segmento del mismo, que reconoce y se aglutina a su objetivo, por ejemplo, una molécula de B7. El dominio extracelular de CTLA4 puede incluir mutaciones que cambian la afinidad de aglutinación de la molécula de CTLA4 hacia una molécula de B7.

Cuando se utilice aquí, "B7" se refiere a la familia de B7 de las moléculas que incluyen, pero no están limitadas a, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) y B7-3 que pueden reconocer y aglutinarse a CTLA4 y/o CD28.

Cuando se utilice aquí, "células positivas de B7" son cualesquiera células con uno o más tipos de moléculas de B7 expresadas sobre la superficie de la célula.

Cuando se utilice aquí, un "derivado" es una molécula que comparte la actividad y homología de la secuencia de su

molécula original. Por ejemplo, un derivado de CTLA4 incluye una molécula de CTLA4 soluble que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos 70 % semejante al dominio extracelular de CTLA4 del tipo silvestre, y que reconoce y se aglutina a B7 por ejemplo, CTLA4Ig o una molécula mutante de CTLA4 soluble L104EA29YIg.

Cuando se utilice aquí, "regular" una respuesta inmune es activar, estimular, regular ascendentemente, inhibir, bloquear, regular descendentemente o modificar la respuesta inmune. Las enfermedades autoinmunes descritas aquí, pueden ser tratadas por la regulación de una respuesta inmune por ejemplo regulando las interacciones de las células positivas de CTLA4 y CD28 funcionales con las células positivas de B7. Por ejemplo, un método para regular una respuesta inmune comprende poner en contacto las células positivas de B7 con una moléculas de CTLA4 solubles de la invención para formar complejos de CTLA4/B7 solubles, la molécula de CTLA4 soluble interfiere con la reacción de una molécula de CTLA4 y/o CD28 endógena con la molécula de B7.

Cuando se utilice aquí, "bloquear" o "inhibir" un receptor, una señal o molécula, significa que se interfiere con la activación del receptor, señal o molécula, como se detectó por una prueba reconocida en el arte. El bloqueo o inhibición puede ser parcial o total. Por ejemplo, el bloqueo de una respuesta inmune mediada por una célula puede

ser detectado por la determinación de la funcionalidad del trasplante, tal como por las concentraciones de la creatinina en el suero después del trasplante renal.

Cuando se utilice aquí, "bloqueo de la interacción de B7" significa que interfiere con la aglutinación de B7 a sus ligandos, tales como CD28 y/o CTLA4, por lo cual se obstruyen las interacciones de las células T y las célula positiva de B7. Los ejemplos de los agentes que bloquean las interacciones de B7 incluyen, pero no están limitados a, moléculas tales como un anticuerpo (o una porción o derivado del mismo) que reconoce y se aglutina a cualquiera de las moléculas de CTLA4, CD28 o B7 (por ejemplo B7-1, B7-2); una forma soluble (o porción o derivado de la misma) de las moléculas tales como CTLA4 soluble; un fragmento del péptido u otra molécula pequeña diseñada para interferir con la señal de la célula por medio de la interacción mediada por CTLA4/CD28/B7. En una modalidad preferida, el agente de bloqueo es una molécula mutante de CTLA4 soluble, tal como L104EA29YIg (ATCC PAT-2104).

Cuando se utilice aquí, "tratar" o "tratando" un trastorno o enfermedad, significa manejar una enfermedad o trastorno por terapias medicinales u otras terapias. El tratamiento de una enfermedad o trastorno puede mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno, reducir la severidad de una enfermedad o trastorno, alterar el curso del progreso

de la enfermedad o trastorno y/o mejorar o curar el problema del trastorno o enfermedad básica. Por ejemplo, tratar un trastorno inmune asociado con el trasplante de injerto debe ser efectuado por la regulación de una respuesta inmune por ejemplo, por la regulación de las interacciones de las células positivas de CD28 y/o CTLA4 funcionales con las células positivas de B7. Alternativamente, tratar una enfermedad o trastorno inmune puede ser efectuado por la prevención o inhibición de la enfermedad o trastorno para que no se presenten o progresen por medio del uso de las composiciones descritas aquí. Por ejemplo, el tratamiento del rechazo de trasplante renal incluye la inhibición del rechazo de trasplante renal como se mide por la velocidad de filtración glomerular (GFR). Por ejemplo tratar los trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto incluye la profilaxis del rechazo de órganos por la administración de L104EA29YIg. Además, el tratamiento de los trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto puede prolongar la supervivencia del órgano trasplantado y del sujeto hospedero.

Cuando se utilice aquí, "enfermedad del sistema inmune" incluye cualquier enfermedad modificada por las interacciones de la célula T con células positivas de B7 incluyendo, pero sin estar limitado a, enfermedades autoinmunes, enfermedades inmunoproliferativas, y trastornos inmunes asociados con el

trasplante de injerto.

Cuando se utilice aquí, "trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto" significa cualquier enfermedad relacionada con trasplante, mediada por las interacciones de las células T con las células positivas de B7 incluyendo, pero sin estar limitado a, trastornos inmunes asociados con el rechazo del trasplante de injerto, trastornos relacionados con los injertos, enfermedad del animal hospedero contra el injerto (GVHD) (por ejemplo, tal como puede resultar del trasplante de médula ósea, o en la inducción de la tolerancia), rechazo agudo del injerto o trasplante y rechazo crónico del injerto o trasplante. El injerto puede ser un órgano sólido, tejido o aloinjertos o xenoinjertos celulares, incluyendo pero sin estar limitados a, la piel, células de islotes (también conocidas como islotes), músculos, hepatocitos, neuronas, corazón, hígado, riñón, pulmón, apéndice, miembros, nariz, oreja o cara.

Cuando se utilice aquí, las enfermedades inmunoproliferativas incluyen, pero no están limitadas a, linfoma de células T, leucemia linfoblástica aguda de las células T, linfoma de las células T angiocéntricas testiculares, y angiitis linfocítica benigna.

Cuando se utilice aquí, enfermedades autoinmunes incluyen, pero no están limitadas a las enfermedades tales como lupus (por ejemplo, lupus eritematoso, nefritis por

lupus), psoriasis, tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, enfermedad de Grave, anemia perniciosa, gastritis atrófica autoinmune, enfermedad de Addison, diabetes (por ejemplo diabetes mellitus dependiente de la insulina, diabetes mellitus del tipo I, diabetes mellitus del tipo II), síndrome de Goodpasture, miastenia grave, pénfigo, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), oftalmitis simpática, uveitis autoinmune, esclerosis múltiple, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis de acción crónica, colitis ulcerativa, síndrome de Sjogren, enfermedades reimática (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis psoriática), polimiositis, escleroderma, y enfermedad del tejido conectivo mezclado.

Para que la invención descrita aquí pueda ser entendida de manera más completa, se da la siguiente descripción.

Composiciones y métodos de la invención

La presente invención proporciona una nueva clase de terapia inmunosupresora para el trasplante. La misma es una proteína de fusión que se aglutina a las moléculas de B7 sobre la superficie de las células que presentan el antígeno (APCs) que inhibe la co-estimulación requerida para la activación de la célula T. Las moléculas mutantes de CTLA4 solubles de la invención, difieren de los inmunosupresores existentes en la distribución respectiva de su objetivo

molecular y la especificidad de su efecto. La presente invención proporciona moléculas mutantes de CTLA4 solubles que reconocen y se aglutinan a CD80 y CD86. En algunas modalidades, los mutantes de CTLA4 solubles tienen una afinidad más elevada hacia CD80 y/o CD86 que hacia CTLA4Ig. Por ejemplo, L104EA29YIg se aglutina aproximadamente 2 veces con más afinidad que CTLA4Ig del tipo silvestre (referido aquí posteriormente como CTLA4Ig) a CD80 y con aproximadamente 4 veces más afinidad hacia CD86. Esta aglutinación más fuerte conduce a que L104EA29YIg sea más efectiva que CTLA4Ig en el bloqueo de las respuestas inmunes.

Una modalidad de la presente invención proporciona métodos para el tratamiento de las enfermedades del sistema inmune. Los métodos comprenden administrar una composición terapéutica, que comprende moléculas mutantes de CTLA4 solubles descritas aquí, a un sujeto en una cantidad efectiva para aliviar al menos uno de los síntomas asociados con las enfermedades del sistema inmune. Adicionalmente, las moléculas mutantes de CTLA4 solubles descritas aquí pueden proporcionar terapia a largo plazo para las enfermedades del sistema inmune por el bloqueo de las interacciones de las células positivas de B7/células T, por lo cual se bloquea la estimulación/activación de las células T por las señales co-estimuladoras tales como la aglutinación de B7 a CD28, conduciendo a la inducción de anergia o tolerancia a las

células T. Las enfermedades del sistema inmune incluyen, pero no están limitadas a, enfermedades autoinmune, enfermedades inmunoproliferativas, y trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto descritos anteriormente.

Otra modalidad proporciona métodos para inducir tolerancia en un sujeto que tiene enfermedades inmune asociadas con el trasplante de injerto, por la administración de una composición terapéutica que comprende las moléculas mutantes de CTLA4 solubles descritas aquí.

Las moléculas mutantes de CTLA4 solubles descritas aquí exhiben propiedades inhibidoras in vivo. Bajo las condiciones en donde están ocurriendo interacciones de las células positivas de B7/células T, por ejemplo las interacciones de las células B/células T, como resultado del contacto entre las células T y las células positivas de B7, la aglutinación de las moléculas mutantes de CTLA4 introducidas para reaccionar con las células positivas de B7, por ejemplo las células B, puede interferir, es decir, inhibir, las interacciones de las células positivas de B7/células B conduciendo a la regulación de las respuestas inmunes.

Otra modalidad proporciona métodos para regular las respuestas inmunes. Las respuestas inmune reguladas descendentemente (reducidas) por las moléculas mutantes de CTLA4 solubles descritas aquí puede ser por medio de la inhibición o bloqueo de una respuesta inmune ya en progreso o

puede involucrar la prevención de la inducción de una respuesta inmune. Las moléculas mutantes de CTLA4 solubles descritas aquí pueden inhibir las funciones de las células T activadas, tales como la proliferación de los linfocitos T, secreción de citocinas y/o producción de citocinas, por la supresión de las respuestas de las células T o por la inducción de la tolerancia específica en las células T, o ambas. Además, las moléculas mutantes de CTLA4 solubles descritas aquí, interfieren con la ruta de CTLA4/CD28/B7 que puede inhibir la proliferación de las células T y/o la secreción de citocinas, y por consiguiente conducen a la destrucción reducida del tejido y a la inducción de anergía o falta de respuesta de las células T.

Las moléculas mutantes de CTLA4 comprenden al menos el dominio extracelular de CTLA4, o porciones de la misma que se aglutinan a CD80 y/o CD86. La porción extracelular de una molécula mutante de CTLA4 comprende una secuencia de aminoácidos que inicia con la metionina en la posición +1 hasta el ácido aspártico en la posición +124 (figura 7, SEC ID NOS: 3 y 4; o figura 8, SEC ID NOS: 5 y 6). Alternativamente, la porción extracelular de la CTLA4 puede comprender una secuencia de aminoácido que empieza con la alanina en la posición -1 hasta el ácido aspártico en la posición +124 (figura 7, SEC ID NOS: 3 y 4; o figura 8, SEC ID NOS: 5 y 6).

En una modalidad, la molécula mutante de CTLA4 soluble es una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de CTLA4 que tiene una o más mutaciones en una región de una secuencia de aminoácido que empieza con la serina en -25 y que finaliza con la arginina en +33 (S25-R33). Por ejemplo, la alanina en la posición +29 del CTLA4 del tipo silvestre puede ser substituida con tirosina (codones: UAU, UAC). Alternativamente, la alanina puede ser substituida con leucina (codones: UUA, UUG, CUU, CUC, CUA, CUG), fenilalanina (codones: UUU, UUC), triptófano (codón: UGG), o treonina (codones: ACU, ACC, ACA, ACG). Como lo entenderán fácilmente las personas expertas en el arte, el nucleótido de uracilo (U) de la secuencia de ARN corresponde al nucleótido de timina (T) de la secuencia de ADN.

En otra modalidad, la molécula mutante de CTLA4 soluble es una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de CTLA4, que tiene una o más mutaciones en, o cerca de una región de una secuencia de aminoácidos que empieza con metionina en +97 y que finaliza con glicina en +107 (M97-G107). Por ejemplo, la leucina en la posición +104 del CTLA4 del tipo silvestre puede ser substituida con el ácido glutámico (codones: GAA, GAC). Una molécula mutante de CTLA4 que tiene esta substitución es referida aquí como L104EIg (figura 8, SEC ID NOS: 5 y 6).

En todavía otra modalidad, la molécula mutante de CTLA4

soluble es una proteína de fusión que comprende el dominio extracelular de CTLA4 que tiene una o más mutaciones en las regiones S25-R33 y M97-G107. Por ejemplo, en una modalidad, una molécula mutante de CTLA4 comprende tirosina en la posición +29 en lugar de la alanina; y ácido glutámico en la posición +104 en lugar de la leucina. Una molécula mutante de CTLA4 que tiene estas substituciones es referida aquí como L104EA29YIg (figura 7, SEC ID NOS: 3 y 4). La molécula de ácido nucléico que codifica L104EA29YIg está contenida en pD16 L104EA29YIg y fue depositada el 19 de junio del 2000 ante el American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 (ATCC No. PTA-2104). El vector de pD16 L104EA29YIg es un derivado del vector de pcDNA3 (INVITROGEN).

La invención proporciona además una molécula mutante de CTLA4 soluble que comprende un dominio extracelular de un mutante de CTLA4 como se muestra en la figura 7 (SEC ID NOS: 3 y 4) o la figura 8 (SEC ID NOS: 5 y 6) o porción(es) de los mismos, y una porción que altera la solubilidad, la afinidad y/o la valencia de la molécula mutante de CTLA4.

De acuerdo con la práctica de la invención, la porción puede ser una región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma, por ejemplo uno o más de un dominio de CH1, la unión, el dominio de CH2 o el dominio de CH3. Para su uso in vivo, se prefiere que la región constante de

inmunoglobulina no produzca una respuesta inmune perjudicial en el sujeto. Por ejemplo, en los protocolos clínicos, puede ser preferido que las moléculas mutantes incluyan regiones constantes de inmunoglobulina del mono o del ser humano. Los ejemplos de los dominios de inmunoglobulina adecuados incluyen, pero no están limitados a, IgCγ1 (IgCgamma1), IgCγ2 (IgCgamma2), IgCγ3 (IgCgamma3), IgCγ4 (IgCgamma4), IgCμ (IgCmu), IgCα1 (IgCalfa1), IgCα2 (IgCalfa2), IgCδ (IgCdelta) o IgCε (IgCepsilon). Otros isótopos son posibles. Además, otras regiones constantes de inmunoglobulina son posibles (preferentemente otras regiones constantes de inmunoglobulina débiles o no inmunogénicas).

Para los protocolos clínicos, se prefiere que la porción de inmunoglobulina no produzca una respuesta inmune perjudicial en un sujeto. La porción preferida es la región constante de inmunoglobulina, incluyendo las regiones constantes de inmunoglobulina del mono o del ser humano. Un ejemplo de una región de inmunoglobulina adecuada es Cγ1 humana, incluyendo la zona de unión, las regiones de CH2 y CH3 que pueden tener un efecto mediador en las funciones efectoras tales como la aglutinación de los receptores de Fc, la mediación de la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), o la mediación de la citotoxicidad mediada por la célula, dependiente del anticuerpo, (ADCC). Las porción de

inmunoglobulina puede tener una o más mutaciones en la misma, (por ejemplo, en el dominio de CH2, para reducir las funciones efectoras tales como CDC o ADCC) en donde la mutación modula la capacidad de aglutinación de la inmunoglobulina a su ligando, por el incremento o la reducción de la capacidad de aglutinación de la inmunoglobulina a los receptores de Fc. Por ejemplo, las mutaciones en la porción de inmunoglobulina pueden incluir cambios en cualquiera o la totalidad de sus residuos de cisteína dentro del dominio de la unión, por ejemplo, las cisteínas en las posiciones +130, +136, y +139 están substituidas con serina (figura 9, SEC ID NO: 8). La porción de inmunoglobulina también puede incluir la prolina en la posición +148 substituida con una serina, como se muestra en la figura 9, (SEC ID NO: 8). Además, las mutaciones en la porción de inmunoglobulina pueden incluir tener la leucina en la posición +144 substituida con fenilalanina, leucina en la posición +145 substituida con ácido glutámico, o glicina en la posición +147 substituida con alanina. Los ejemplos de porciones de inmunoglobulina incluyen aquellas descritas y mencionadas en las publicaciones de patente U.S. Nos. 2002/0114814 A1 y 2004/0151725 A1, patentes U.S. Nos. 6,444,792 y 6,750,334 y WO 97/28267.

Otras porciones incluyen las etiquetas del polipéptido. Los ejemplos de las etiquetas adecuadas incluyen pero no

están limitadas a la molécula de p97, la molécula env gp 120, la molécula E7, y la molécula ova (Dash, B., et al. (1994) J. Gen. Virol. 75:1389-97; Ikeda, T., et al. (1994) Gene 138:193-6; Falk, K., et al. (1993) Cell. Immunol. 150:447-52; Fujisaka, K. et al. (1994) Virology 204: 789-93). Otras moléculas para su uso como etiquetas son posibles (Gerard, C. et al. (1994) Neuroscience 62:721-739; Byrn, R. et al. J. Virol. (1989) 63:4370-4375; Smith, D. et al., (1987) Science 238:1704-1707; Lasky, L., (1996) Science 233:209-212).

La invención proporciona además proteínas de fusión de CTLA4Ig mutantes, solubles, preferentemente más reactivas con los antígenos de CD80 y/o CD86 comparado con el CTLA4 del tipo silvestre. Un ejemplo es L104EA29YIg como se muestra en la figura 7 (SEC ID NOS: 3 y 4).

En otra modalidad, la molécula mutante de CTLA4 soluble incluye un residuo de aminoácido de unión, el cual está localizado entre la porción de CTLA4 y la porción de inmunoglobulina. El aminoácido de unión puede ser cualquier aminoácido, incluyendo glutamina. El aminoácido de unión puede ser introducido por loS métodos de síntesis químicos o moleculares conocidos en el arte.

En otra modalidad, la molécula mutante de CTLA4 soluble, incluye la porción de inmunoglobulina (por ejemplo, los dominios de unión, CH2 y CH3), en donde cualquiera o la totalidad de los residuos de cisteína dentro del dominio de

unión de la porción de inmunoglobulina están substituidos con serina, por ejemplo, la cisteínas en las posiciones +130, +136 o +139 (figura 7, SEC ID NOS: 3 y 4; o figura 8, SEC ID NOS: 5 y 6). La molécula mutante también puede incluir la prolina en la posición +148 substituida por una serina, como se muestra en la figura 7 (SEC ID NOS: 3 y 4) o figura 8 (SEC ID NOS: 5 y 6).

La molécula mutante de CTLA4 soluble puede incluir una secuencia del péptido de la señal enlazada al extremo N-terminal del dominio extracelular de la porción de CTLA4 de la molécula mutante. El péptido de la señal puede ser cualquier secuencia que permitirá la secreción de la molécula mutante, incluyendo el péptido de la señal de oncostatina M (Malik, et al., (1989) Molec. Cell. Biol. 9:2847-2853), o CD5 (Jones, N. H. et al., (1986) Nature 323:346-349), o el péptido de la señal de cualquier proteína extracelular.

La molécula mutante puede incluir el péptido de la señal de oncostatina M, enlazado al extremo N-terminal del dominio extracelular de CTLA4, y la molécula de inmunoglobulina humana (por ejemplo, los dominios de unión, CH2 y CH3) enlazados al extremo C-terminal del dominio extracelular de CTLA4. Esta molécula incluye el péptido de la señal de la oncostatina M que abarca una secuencia de aminoácidos que tiene la metionina en la posición -26 hasta la alanina en la posición -1, la porción de CTLA4 abarca una secuencia de

aminoácidos que tiene a la metionina en la posición +1 hasta el ácido aspártico en la posición +124, una glutamina del residuo de aminoácido de unión en la posición +125, y la porción de inmunoglobulina que abarca una secuencia de aminoácido que tiene el ácido glutámico en la posición +126 hasta la lisina en la posición +357 o la glicina en la posición +356.

Las moléculas mutantes de CTLA4 solubles de la invención pueden ser obtenidas por los métodos de síntesis moleculares o químicos. Los métodos moleculares puede incluir las siguientes etapas: introducir una célula hospedera adecuada con una molécula de ácido nucléico que expresa y codifica la molécula mutante de CTLA4 soluble; cultivar la célula hospedera así introducida bajo condiciones que permitan que la célula hospedera exprese las moléculas mutantes, y aislar las moléculas mutantes expresadas. La porción del péptido de la señal de la molécula mutante permite que las moléculas de proteína sean expresadas sobre la superficie celular y que sean secretadas por la célula hospedera. Las moléculas mutantes traducidas pueden padecer una modificación post-traduccional, que involucra la segmentación del péptido de la señal para producir una proteína madura que tiene el CTLA4 y las porciones de inmunoglobulina. La segmentación puede ocurrir después de la alanina en la posición -1, conduciendo a una molécula mutante madura que tiene la metionina en la

posición +1 como el primer aminoácido (figura 7, SEC ID NOS: 3 y 4; o la figura 8, SEC ID NOS: 5 y 6). Alternativamente, la segmentación puede ocurrir después de la metionina en la posición -2, conduciendo a una molécula mutante madura que tiene la alanina en la posición -1 como el primer aminoácido.

Un experto en el arte podría estar advertido que la expresión de L104EA29YIg en las células de mamífero puede conducir a la producción de las variantes de N y C-terminales, de tal modo que las proteínas producidas pueden tener la secuencia de aminoácidos de los residuos: (i) +1 hasta +357, (ii) -1 hasta +357; (iii) +1 hasta +356 o (iv) -1 hasta 356 (figura 7, SEC ID NOS: 3 y 4; o figura 8, SEC ID NOS: 5 y 6).

Una modalidad preferida es una molécula mutante de CTLA4 soluble que tiene el dominio extracelular de CTLA4 humano, enlazado a la totalidad o a una porción de una molécula de inmunoglobulina humana (por ejemplo, los dominios de unión, CH2 y CH3). Esta molécula preferida incluye la porción de CTLA4 de la molécula soluble que abarca una secuencia de aminoácidos que tiene la metionina en la posición +1 hasta el ácido aspártico en la posición +124, una glutamina del residuo de aminoácido de unión en la posición +125, y la porción de inmunoglobulina que abarca el ácido glutámico en la posición +126 hasta la lisina en la posición +357. La porción que tiene el dominio extracelular de CTLA4 es mutada

de modo que la alanina en la posición +29 sea substituida con la tirosina, y la leucina en la posición +104 sea substituida con el ácido glutámico. La porción de inmunoglobulina de la molécula mutante puede ser mutada, de modo que las cisteínas en las posiciones +130, +136, y +139 sean substituidas con serina, y la prolina en la posición +148 sea substituida con serina. Esta molécula mutante está designada aquí como L104EA29YIg (figura 7, SEC ID NOS: 3 y 4).

Otra modalidad de L104EA29YIg es una molécula mutante que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene la alanina en la posición -1 hasta el ácido aspártico en la posición +124, una glutamina del residuo de aminoácidos de unión en la posición +125, y la porción de inmunoglobulina que abarca el ácido glutámico en la posición +126 (por ejemplo, +126 hasta la lisina en la posición +357). La porción que tiene el dominio extracelular de CTLA4 es mutada de modo que la alanina en la posición +29 sea reemplazada con tirosina; y la leucina en la posición +104 sea reemplazada por el ácido glutámico. La porción de inmunoglobulina de la molécula mutante es mutada de modo que las cisteínas en las posiciones +130, +136, y +139 sean reemplazadas con serina, y la prolina en la posición +148 sea reemplazada con serina. Esta molécula mutante es designada aquí como L104EA29YIg (figura 7, SEC ID NOS: 3 y 4). Después que la secuencia de la señal ha sido segmentada, L104EA29YIg puede empezar, ya sea con una

metionina en la posición +1, o empezar con la alanina en la posición -1.

Otra molécula mutante de la invención es una molécula mutante de CTLA4 soluble que tiene un domino extracelular de CTLA4 humana enlazado a la molécula de inmunoglobulina humana (por ejemplo, los dominios de unión, CH2 y CH3). Esta molécula incluye la porción de la secuencia de aminoácidos que codifica CTLA4 que empieza con la metionina en la posición +1 hasta el ácido aspártico en la posición +124, una glutamina del residuo de aminoácidos de unión en la posición +125, y la porción de inmunoglobulina que abarca una secuencia de aminoácidos que tiene el ácido glutámico en la posición +126 hasta la lisina en la posición +357. La porción que tiene el dominio extracelular de CTLA4 es mutada de modo que la leucina en la posición +104 sea substituida con el ácido glutámico. La porción de unión de la molécula mutante es mutada de modo que las cisteínas de las posiciones +130, +136, y +139 sean substituidas con serina, y la prolina en la posición +148 sea substituida con serina. Esta molécula mutante está designada aquí como L104EIg (figura 8, SEC ID NOS: 5 y 6).

Alternativamente, una modalidad de L104EIg es una molécula mutante de CTLA4 soluble que tiene un dominio extracelular de CTLA4 humano enlazado a la molécula de inmunoglobulina humana (por ejemplo, los dominios de unión

CH2 y CH3). Esta molécula preferida incluye la porción de CTLA4 que abarca una secuencia de aminoácidos que empieza con la alanina en la posición -1 hasta el ácido aspártico en la posición +124, una glutamina del residuo de aminoácidos de unión en la posición +125, y la porción de inmunoglobulina que abarca el ácido glutámico en la posición +126 hasta la lisina en la posición +357. La porción que tiene el dominio extracelular de CTLA4 es mutada de modo que la leucina en la posición +104 sea substituida por el ácido glutámico. La porción de unión de la molécula mutante es mutada de modo que las cisteínas en las posiciones +130, +136, y +139 sean substituidas con serina, y la prolina en la posición +148 sea substituida con serina. Esta molécula mutante está designada aquí como L104EIg (figura 8, SEC ID NOS: 5 y 6).

Además, la invención proporciona una molécula mutante de CTLA4 soluble que tiene: (a) una primera secuencia de aminoácidos de una glicoproteína de la membrana, por ejemplo, CD28, CD86, CD80, CD40, y gp39, la cual bloquea la proliferación de las células T, fusionada a una segunda secuencia de aminoácidos; (b) la segunda secuencia de aminoácidos es un fragmento del dominio extracelular de la CTLA4 mutante que bloquea la proliferación de las células T, tal como, por ejemplo una molécula de aminoácido que comprende la metionina en la posición +1 hasta el ácido aspártico +124 (figura 7, SEC ID NOS: 3 y 4; o figura 8, SEC

ID NOS: 5 y 6); y (c) una tercera secuencia de aminoácidos que actúa como una etiqueta de identificación o mejora la solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la tercera secuencia de aminoácidos puede consistir esencialmente de los residuos de aminoácidos de las regiones de unión, CH2 y CH3 de una molécula de inmunoglobulina no inmunogénica. Los ejemplos de las moléculas de inmunoglobulina adecuadas incluyen, pero no están limitados a, inmunoglobulina humana o del mono, por ejemplo, IgCγ. Otro isotipos también son posibles.

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de un trastorno inmune asociado con el trasplante de injertos por la administración a un sujeto de una dosis efectiva de una molécula mutante de CTLA4 con un dominio extracelular de CTLA4 como se muestra en la SEC ID NO: 8 que empieza con la alanina en la posición 26 o la metionina en la posición 27 y que finaliza con el ácido aspártico en la posición 150, o una porción del mismo. Adicionalmente, en el dominio extracelular o una porción del mismo, una alanina en la posición 55 está substituida con una tirosina, y una leucina en la posición 130 está substituida con el ácido glutámico. Además, el régimen de administración comprende un régimen de fase inicial, en donde el régimen de fase inicial puede variar desde los primeros 3 a 6 meses post-trasplante e involucra la administración que inicialmente es más frecuente que mensualmente.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno inmune asociado con el trasplante de injerto por la administración a un sujeto de una dosis efectiva de la molécula mutante de CTLA4 con una secuencia de aminoácidos que empieza con la metionina en la posición 27 y que finaliza con el ácido aspártico en la posición 150 de la SEC ID NO: 4, o con una secuencia de aminoácidos que empieza con la alanina en la posición 26 y que finaliza con el ácido aspártico en la posición 150 de la SEC ID NO: 4. Además, el régimen de administración de la molécula mutante de CTLA4 comprende un régimen de fase inicial, en donde el régimen de fase inicial puede variar desde los primeros 3 a 6 meses post-trasplante e involucra la administración que inicialmente es más frecuente que mensualmente.

La invención proporciona además moléculas de ácido nucléico que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos correspondientes a las moléculas mutantes de CTLA4 solubles de la invención. En una modalidad, la molécula de ácido nucléico es un ADN (por ejemplo, ADNc) o un híbrido de la misma. Alternativamente las moléculas de ácido nucléico son el ARN o los híbridos de las mismas.

Adicionalmente, la invención proporciona un vector que comprende las secuencias de mucleótidos de la invención.

También se proporciona un sistema de vector hospedero. El sistema de vector hospedero comprende el vector de la invención en una célula hospedera adecuada. Los ejemplos de las células hospederas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, células procarióticas y eucarióticas.

La invención incluye composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de los trastornos inmunes asociados con el trasplante de injertos que comprenden dosis farmacéuticamente efectivas de las moléculas mutantes de CTLA4 solubles. En ciertas modalidades, los trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto son mediados por las interacciones de las células positivas de CD28 y/o CTLA4 con las células positivas de CD80 y/o CD86. Las moléculas mutantes de CTLA4 solubles son preferentemente moléculas de CTLA4 que tienen una o más mutaciones en el dominio extracelular de CTLA4. La composición farmacéutica puede incluir moléculas de proteína mutante de CTLA4 solubles y/o moléculas de ácido nucléico, y/o vectores que codifican las moléculas. En las modalidades preferidas, las moléculas mutantes de CTLA4 solubles tienen la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de CTLA4 como se muestra ya sea en la figura 7 (SEC ID NOS: 3 y 4) o en la figura 8 (SEC ID NOS: 5 y 6), L104EA29Y o L104E, respectivamente. Aún más preferentemente, la molécula mutante de CTLA4 soluble es L104EA29YIg como se describió aquí. Las composiciones pueden

incluir adicionalmente otros agentes terapéuticos, incluyendo, pero sin estar limitado a, toxinas del fármaco, enzimas, anticuerpos, o conjugados.

Las composiciones farmacéuticas también incluyen preferentemente portadores y adyuvantes adecuados que incluyen cualquier material que cuando se combina con la molécula de la invención (por ejemplo una molécula mutante de CTLA4 soluble, tal como L104EA29Y o L104E) retenga la actividad de la molécula y no sea reactiva con el sistema inmune del sujeto. Los ejemplos de los portadores y adyuvantes adecuados incluyen, pero no están limitados a, albúmina del suero humano, intercambiadores de iones; albúmina; lecitina; substancias amortiguadoras, tales como fosfatos; glicina; ácido sórbico; sorbato de potasio; y sales o electrólitos, tales como sulfato de protamina. Otros ejemplos incluyen cualquiera de los portadores farmacéuticos estándares tales como una solución salina amortiguada con fosfato; agua; emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua; y varios tipos de agentes humectantes. Otros portadores también pueden incluir soluciones estériles; tabletas, incluyendo tabletas recubiertas y cápsulas. Típicamente, tales portadores contienen excipientes tales como el almidón, la leche, el azúcar, ciertos tipos de arcilla, gelatina, ácido esteárico o sales del mismo, estearato de magnesio o calcio, talco, grasas o aceites

vegetales, gomas, glicoles, u otros excipientes conocidos. Tales portadores también pueden incluir aditivos de sabor y color u otros ingredientes. Las composiciones que comprenden tales portadores son formuladas por los métodos convencionales bien conocidos. Tales composiciones también pueden ser formuladas dentro de varias composiciones de lípidos, tales como, por ejemplo, liposomas así como en varias composiciones poliméricas, tales como microesferas de polímero.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas utilizando los modos tradicionales de administración que incluyen, pero no están limitados a, la administración intravenosa (i.v.), la administración intraperitoneal (i.p.), la administración intramuscular (i.m.), la administración subcutánea, la administración oral, la administración como un supositorio, o como un contacto tópico, o el implante de un dispositivo de liberación lenta tal como una bomba miniosmótica al sujeto.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar en una variedad de formas de dosificación, las cuales incluyen, pero no están limitadas a, soluciones u suspensiones líquidas, tabletas, píldoras, polvos, supositorios, microcápsulas o microvesículas poliméricas, liposomas, y soluciones inyectables o infusionables. La forma preferida depende del modo de administración y de la

aplicación terapéutica.

Una composición farmacéutica típica de la invención para administración intravenosa (i.v.) es listada en seguida.

Composición de L104EA29YIg liofilizada. 100 mg/vial del producto del fármaco

Componente	Cantidad/vial (mg)[a]
L104EA29YIg	110[a]
Sucrosa	220
Fosfato de Sodio Monobásico Monohidratado	15.18
Cloruro de sodio	2.55
Hidróxido de sodio 1N	Ajustar a pH 7.5
Acido Clorhídrico 1N	Ajustar a pH 7.5

[a]Cada vial contiene 10% de sobrerrelleno para contener el vial, la aguja y la jeringa de la solución reconstituida

El producto del fármaco liofilizado puede ser reconstituido con un portador acuoso. El portador acuoso de interés aquí es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, después de la liofilización. Típicamente, el producto del fármaco liofilizado está constituido hasta aproximadamente 25 mg/ml con 10 ml de ya sea Agua Estéril para Inyección, USP (SWFI) o Inyección de Cloruro de Sodio al 0.9 %, USP. La solución reconstituida es diluida adicionalmente hasta las concentraciones del producto del fármaco entre 1 y 10 mg/ml

con una Inyección de Cloruro de Sodio al 0.9 %, USP. El producto del fármaco diluido para la inyección es isotónico y adecuado para la administración por infusión intravenosa.

Un agente tensioactivo puede ser agregado a la formulación en una cantidad suficiente para reducir o prevenir la interacción del producto del fármaco constituido con una jeringa de silicón.

El modo más efectivo de administración y régimen de dosificación para las composiciones de esta invención depende de la severidad y el curso de la enfermedad, la salud del paciente y la respuesta al tratamiento y el juicio del médico que proporciona la atención. En consecuencia, las especificaciones (también conocidas como dosis) de las composiciones deben ser tituladas con respecto al paciente individual.

Las moléculas mutantes de CTLA4 solubles pueden ser administradas a un sujeto en una cantidad, a una frecuencia sobre un período de tiempo (por ejemplo en un intervalo de tiempo y/o en intervalos de tiempo múltiples) suficiente para bloquear las moléculas de B7 endógenas (por ejemplo, CD80 y/o CD86) de la aglutinación a sus ligandos respectivos, en el sujeto. El bloqueo de la aglutinación del ligando/B7 endógeno inhibe las interacciones entre las células positivas de B7 (por ejemplo, las células positivas de CD80 y/o CD86) con las células positivas de CD28 y/o CTLA4. La dosificación de un

agente terapéutico depende de muchos factores incluyendo, pero sin estar limitado a, el tipo de tejido afectado, el tipo de trastorno inmune asociado con el trasplante de injerto que es tratado, la severidad de la enfermedad, la salud del sujeto, y una respuesta del sujeto al tratamiento con los agentes.

Las dosis de las moléculas o las composiciones farmacéuticas de la invención están basadas en el peso corporal, y los regímenes de administración pueden ser dictados por los perfiles sinclinales del suero objetivo. Típicamente, la concentración del suero sinclinal objetivo de las moléculas mutantes de CTLA4 de la invención entre aproximadamente 3 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml durante los primeros 3 a 6 meses post-trasplante será suficiente para mantener la función del aloinjerto, preferentemente entre aproximadamente 5 µg/ml y aproximadamente 20 µg/ml. Típicamente, la concentración del suero sinclinal objetivo de las moléculas mutantes de CTLA4 de la invención durante la fase de mantenimiento es de entre aproximadamente 0.2 µg/ml y aproximadamente 3 µg/ml, preferentemente entre aproximadamente 0.25 µg/ml y aproximadamente 2.5 µg/ml.

Las moléculas mutantes de CTLA4 de la invención pueden ser administradas en una cantidad de entre aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 20.0 mg/kg de peso del paciente, típicamente entre aproximadamente 1.0 hasta aproximadamente

15.0 mg/kg. Por ejemplo, L104EA29Y puede ser administrado a 10 mg/kg de peso del paciente durante la fase inicial, el período de riesgo elevado que sigue al trasplante y se reduce a 5 mg/kg de peso del paciente para una dosificación de mantenimiento.

La administración de las moléculas o composiciones farmacéuticas de la invención puede ser efectuada durante varios intervalos de tiempo. Típicamente los regímenes de administración incluyen una fase inicial, en la cual las dosis son más elevadas y la frecuencia de administración es incrementada durante el período de riesgo inmunológico más grande, seguido por una fase de mantenimiento. El régimen de fase inicial puede variar desde los primero 3 a 6 meses post-trasplante e involucra la administración que inicialmente es más frecuente que mensualmente, preferentemente tan frecuente como diariamente, semanalmente o cada dos semanas. La fase de mantenimiento empieza cuando finaliza la fase inicial e involucra la administración que no es más frecuente que mensualmente, y permanece durante un período prolongado como sea necesario, típicamente durante un período tan prolongado como el que el paciente retenga el trasplante. Cuando se utilice aquí, el día 1 está definido como el día del trasplante o el primer día de tratamiento con las moléculas o composiciones farmacéuticas de la invención.

La dosificación de las moléculas mutantes de CTLA4 de la

invención en la fase inicial es de aproximadamente 8 hasta aproximadamente 12 mg/kg de peso del paciente, preferentemente de manera aproximada 10 mg/kg. La dosificación de las moléculas mutantes de CTLA4 de la invención en la fase de mantenimiento es de aproximadamente 3 hasta aproximadamente 7 mg/kg de peso del paciente, preferentemente de manera aproximada 5 mg/kg.

La fase inicial puede variar desde los primeros 3 a 6 meses post-trasplante. El régimen de administración durante la fase inicial puede variar dependiendo el estado del receptor y/o el injerto. Por ejemplo, un régimen de fase inicial más intenso podría administrar una dosis más elevada de las moléculas o de las composiciones farmacéuticas de la invención en el día 1, día 5, semana 2 de visita (por ejemplo los días 13-17), luego cada dos semanas durante los primeros 3 meses (por ejemplo en la semana 4 de visita, semana 6 de visita, semana 8 de visita, semana 10 de visita, y semana 12 de visita), seguido por la administración mensual hasta el mes 6 de visita (por ejemplo, el mes 4 de visita, el mes 5 de visita, y el mes 6 de visita). Un ejemplo de un régimen de fase inicial típico más intenso, es la administración de 10 mg/kg de peso del paciente de L104EA29YIg en los días 1, 5, 15, 29, 43, 57, 71, 85, 113, 141 y 169. Un régimen menos intenso podría administrar las moléculas o las composiciones farmacéuticas de la invención el día 1, semana 2 de visita,

semana 4 de visita, luego mensualmente hasta el mes 3 de visita. Un ejemplo de un régimen de fase inicial menos intenso, típico, es la administración de 10 mg/kg de peso del paciente de L104EA29YIg en los días 1, 15, 29, 57 y 85.

Típicamente, una fase inicial es seguida por una fase de mantenimiento en donde las dosis inferiores de las moléculas o las composiciones farmacéuticas de la invención son administradas en intervalos de uno a dos meses durante un período tan prolongado como sea necesario, típicamente durante un período tan prolongado como el que el paciente retenga el trasplante. Un ejemplo de la fase de mantenimiento para el régimen más intenso, descrito anteriormente, incluye la administración mensual de 5 mg/kg del peso del paciente de L104EA29YIg iniciando en el mes de visita 7. Mientras que un ejemplo de la fase de mantenimiento para el régimen menos intenso anterior podría incluir la administración mensual de 5 mg/kg del peso del paciente del L104EA29YIg iniciando en el mes 4 de la visita.

Alternativamente, algún conocedor del arte podría ser capaz de modificar el régimen de administración en respuesta al estado de riesgo de los pacientes y/o la respuesta a la terapia post-trasplante. Por ejemplo, la fase inicial del régimen menos intenso descrita anteriormente podría ser modificada agregando la administración en el día 5 al régimen, por lo cual se incrementa la frecuencia de

administración durante el período de mayor riesgo inmunológico.

Cuando se utilice aquí, "cuatro semanas", "mes", "meses" o "mensualmente" se refieren a un período de 28 ± 5 días. Cuando se utilice aquí, "dos semanas" se refiere a un período de 14 ± 3 días.

Se requiere la flexibilidad en los regímenes de administración para facilitar el programa de administración en las vidas de los receptores del trasplante, mientras que se mantiene el perfil sinclinal objetivo de las moléculas mutantes de CTLA4 de la invención. Las ventanas permitidas para la administración de las dosis pueden ser como sigue:

Visita	Ventana de la visita
Día 1 y día 5	Separación de 96 horas ± 6 horas
Semana 2	Fecha objetivo ± 2 días
Semana 4 - Mes 6	Fecha objetivo ± 3 días
Desde el mes 7 después de esta	Fecha objetivo ± 5 días

La fecha objetivo es el resultado de agregar la duración deseada a la fecha de visita real previa. La duración deseada para la semana 2 de visita es de 10 días. La duración deseada es de 14 días para una visita planeada para dos semanas desde la semana previa, por ejemplo, una semana 6 de visita después

de una semana 4 de visita. La duración deseada es de 28 días para una visita planeada para un mes o cuatro semanas desde la visita previa, por ejemplo un visita del mes 4 después de una visita del mes 3. La duración deseada es de 56 días para una visita planeada durante dos meses desde la visita previa, por ejemplo una visita del mes 8 después de una visita del mes 6. Por ejemplo, una fecha de visita real del día 15 más 14 días, conduce a una fecha objetivo de la semana 4 del día 29. Basado en las ventanas de visita anteriores, la administración puede ocurrir el día 29 $\pm$ 3 días. En el caso de que la administración ocurra el día 26, ese día llega a ser la fecha de visita real utilizada para el cálculo de la siguiente fecha objetivo.

El riesgo bajo de los receptores de rechazo agudo típicamente incluye aquellos quienes reciben trasplantes de donadores relacionados vivientes y receptores/donadores que son muy compatibles. El riesgo elevado de receptores con rechazo agudo típicamente incluye aquellos quienes reciben trasplantes de donadores marginales o re-trasplantes, que tienen anticuerpos reactivos de un panel elevado o son de Americanos Africanos.

Además del riesgo intermedio del rechazo de trasplante agudo, el uso de fármacos de mantenimiento tales como los inhibidores de calcineurina y esteroides en el término de largo plazo, conduce a toxicidades que tienen impacto

negativo sobre los resultados a largo plazo y la calidad de vida del paciente. Por ejemplo, los efectos secundarios de los fármacos de mantenimiento incluyen nefrotoxicidad (CAN) que conduce a una función renal declinante y/o pérdida del injerto, y a enfermedades cardiovasculares y metabólicas tales como hipertensión, hiperlipidemia y diabetes, que conducen a la enfermedad y muerte cardiovascular. Los efectos laterales adicionales incluyen hirsutismo, alopecia, hiperplasia gingival, temblores, neurotoxicidad y pérdida ósea, que conducen a una calidad de vida reducida y no confortable. Las moléculas o composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser utilizadas para evitar estos resultados, para reducir la incidencia, desarrollo, y/o progreso de estos resultados cuando se tratan trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto, o cuando se tratan trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto en sujetos con riesgo a estos resultados. Las moléculas o composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser utilizadas para mejorar el funcionamiento renal tal como se mide por GFR.

La administración de las moléculas o composiciones farmacéuticas de la invención puede ser por medio de una infusión intravenosa de 30 minutos hasta una o más horas. Alternativamente, una sola inyección subcutánea hasta inyecciones subcutáneas múltiples pueden suministrar la

dosificación requerida. Típicamente, una infusión intravenosa de 30 minutos es la ruta de administración utilizada durante la fase inicial del tratamiento mientras que el paciente está en el hospital y/o haciendo visitas programadas al profesional del cuidado de la salud para verificación. La inyección subcutánea es el modo de administración típico utilizado durante la fase de mantenimiento, por lo cual se le permite al paciente regresar a su programa normal, reduciendo las visitas a un profesional del cuidado de la salud para infusiones intravenosas.

Una modalidad alternativa de la invención proporciona un método para el tratamiento de un trastorno inmune asociado con el trasplante de injerto en sujetos que han recibido una terapia inmunosupresora alterna post-trasplante. Los sujetos en una terapia inmunosupresora farmacéutica alternativa pueden cambiar o conmutar o convertirse a una terapia que incluye las moléculas o composiciones farmacéuticas de la presente invención, por lo cual se elimina el fármaco alternativo. Típicamente, el elemento farmacéutico que va a ser eliminado es retirado gradualmente durante un período de tiempo apropiado, basado en las instrucciones de prescripción de este fármaco específico, mientras que al mismo tiempo las moléculas o la composición farmacéutica de la presente invención son administradas más frecuentemente que mensualmente. Una vez que el sujeto está completamente fuera

del fármaco alternativo, el sujeto puede regresar a un régimen de mantenimiento estándar que utiliza las moléculas o composiciones farmacéuticas de la presente invención. Por ejemplo, un sujeto que recibe un régimen de CsA/MMF ± corticosteroides puede cambiar a CsA con L104EA29YIg por un régimen de L104EA29YIg/MMF ± corticosteroides. El programa de administración de conversión puede incluir la reducción gradual de la dosis de CsA durante dos meses y la administración de 5 mg/kg de L104EA29YIg cada dos semanas durante estos dos meses. Una vez que el CsA es eliminado, el sujeto podría entrar entonces a la fase de mantenimiento y continuar recibiendo 5 mg/kg cada 4 u 8 semanas por la duración del tratamiento en la ausencia de CsA.

Una molidad proporciona dosificaciones apropiadas para una molécula mutante de CTLA4 descrita aquí que es efectiva para bloquear las interaccions de B7 con su ligando y/o para tratar una enfermedad del sistema inmune. Por ejemplo, la dosificación puede estar basada en el peso corporal, y el régimen de administración puede ser dictado por los perfiles reducidos en el suero objetivo. Por ejemplo, las concentraciones del suero reducidas de objetivo efectivas de las moléculas mutantes de CTLA4 descritas aquí para tratar una enfermedad del sistema inmune pueden estar entre aproximadamente 0.2 µg/ml, y aproximadamente 30 µg/ml. Alternativamente, las moléculas mutantes de CTLA4 solubles

descritas aquí pueden ser administradas en una cantidad entre aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 20.0 mg/kg de peso del paciente para tratar la enfermedad del sistema inmune.

La presente invención proporciona además métodos para el tratamiento de los trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto. En las modalidades particulares, los trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto son mediados por las interacciones de las células positivas de CD28 y/o CTLA4 con las células positivas de CD80/CD86. En una modalidad adicional, las interacciones de la célula T son inhibidas. Estos métodos comprenden administrar a un sujeto las moléculas mutantes de CTLA4 solubles de la invención para regular las interacciones de las células T con las células positivas de CD80 y/o CD86. Los ejemplos de los trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto, son descritos anteriormente.

La presente invención proporciona además un método para la profilaxis o para inhibir o prevenir los rechazos de trasplantes de órganos sólidos, tejidos, células y/o de la anatomía externa por un sujeto, el sujeto es un receptor del trasplante del órgano sólido, tejido, células y/o de la anatomía externa. Típicamente, en los trasplantes, el rechazo del injerto es iniciado a través de su reconocimiento como algo extraño por las células T, seguido por una respuesta inmune que destruye el injerto. Las moléculas mutantes de

CTLA4 solubles de esta invención, por la inhibición de la proliferación de los linfocitos T y/o la secreción de citocina, pueden conducir a una destrucción reducida del tejido y a la inducción de falta de respuesta de las células T específicas del antígeno, lo cual puede conducir a la aceptación del injerto a largo plazo.

El estudio descrito en el ejemplo 3 comparó la eficacia y la seguridad de L104EA29YIg como un inmunosupresor del mantenimiento con la ciclosporina A (CsA) durante 12 meses cuando se utilizó como parte de un régimen de combinación libre de CNI, que consiste de la inducción de basiliximab (Simulect®; Novartis), micofenolato mofetilo (MMF; CellCept®; Roche), y corticosteroides en los receptores de trasplante renal. Los objetivos incluyeron la evaluación de la incidencia del rechazo agudo (presumidos o confirmados por biópsia) a los 6 meses y 1 año; la velocidad de filtración glomerular medida (GFR) por medio de la depuración de iohexol en los meses 1, 6, y 12; los parámetros de hipertensión que incluyen el colesterol y los triglicéridos en el suero; y la seguridad total. Otros análisis pre-especificados incluyeron la muerte del paciente o la pérdida del injerto en el año 1; la severidad del rechazo agudo, la incidencia de diabetes mellitus post-trasplante [definida como cualquier terapia requerida para hiperglucemia durante $\geq$ 4 semanas, o una hemoglobina A1C (HbA1c) > 7 %, en los pacientes no conocidos

previamente que van a ser diabéticos]; GFR calculado, utilizando la modificación de la dieta en la enfermedad renal (MDRD, Levey AS, Bosch JP, Lewis JP, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med 1999; 130:461-470), Jelliffe (RW. Creatinine clearance: Bedside estimate. Ann Intern Med. 1973;79:604-605), Cockcroft-Gault (Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976;16:31-41), y Nankivell (Nankivell BJ, Gruenewald SM, Allen RD, Chapman JR. Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. Transplantation. 1995;59(12):1683-1689) formulas; pharmacokinetics and immunogenicity. El diagnóstico y tratamiento del rechazo agudo (AR) estuvo basado en el grado y el criterio de Banff 97 (Racusen LC, Solez K. Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int 1999;55(2):713-23.). El análisis post-hoc fue llevado a cabo sobre la incidencia de la nefropatía del aloinjerto crónico (CAN por sus siglas en inglés).

Este estudio de 12 meses demostró que la terapia de mantenimiento basada en L104EA29YIg confirió una eficacia equivalente en la prevención de AR y una supervivencia semejante del paciente e injerto comparado con CsA. Además,

L104EA29YIg demostró mejoras significativas en la función renal y reducciones en CAN comparado con la inmunosupresión de mantenimiento a base de CsA. L104EA29YIg fue seguro y bien tolerado y no estuvo asociado con toxicidades relacionadas con CNI típicas.

La función renal mejorada durante el primer año post-trasplante se ha mostrado que se correlaciona con mejores resultados a largo plazo (Hariharan S, McBride MA, Cherikh WS, Tolleris CB, Bresnahan BA, Johnson CP. Post-transplant renal function in the first year predicts long-term kidney transplant survival. Kidney Int 2002;62(1):311-8), puesto que el uso a largo plazo de CNIs está limitado por su nefrotoxicidad (Danovitch GM. Immunosuppressive medications for renal transplantation: a multiple choice question. Kidney Int 2001;59(1):388-402), lo cual conduce a una función reducida de injerto e insuficiencia renal con todos sus problemas conducentes. Así, quizás los descubrimientos más notables observados con el tratamiento con L104EA29Yig son los GFRs superiores, unidos con la histología renal a los 12 meses que muestra reducciones en el desarrollo y/o progreso de CAN comparado con CsA. Esto fue un resultado sorprendente y la primera vez que un descubrimiento de esta clase ha sido mostrado en un ensayo de fase II aleatoria de una terapia inmunosupresora. Puesto que la conservación de la masa del nefrón, por la prevención de los ataques inmunológicos,

cardiovasculares y/o metabólicos, contribuye a efectos benéficos sobre tanto la supervivencia del paciente como del injerto, es posible que L104EA29YIg pueda estar asociado con mejores resultados a largo plazo.

Estos asuntos son particularmente importantes con el uso creciente de órganos de receptores o donadores de criterios extendidos puesto que estos son particularmente susceptibles a toxicidad relacionada con CNI. La reducción de la incidencia de eventos de CV y metabólicos en pacientes que han padecido trasplante renal, también es un asunto central para mejorar los resultados a largo plazo.

Las moléculas o composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser utilizadas para tratar los trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto en sujetos que son receptores de criterios extendidos y/o quienes reciben injertos de donadores de criterios extendidos. Estos criterios, los cuales pueden estar basados en parte en los criterios expedidos por la United Network of Organ Sharing (UNOS) pueden uno o más de los siguientes: edad del donador menor que 10 años o mayor que o igual a 60 años; donador después de una muerte cardiaca, tiempo isquémico por frío anticipado del órgano del donador mayor o igual a 24 horas; sujetos que padecen el trasplante por primera vez con una PRA actual $\geq$ 50 %, o que padecen un retrasplante con PRA $\geq$ 30 %; sujetos con pérdida de injerto previa debido al rechazo agudo

durante los primeros 6 meses después del trasplante; sujetos con correspondencia cruzada linfocitotóxica de las células T positivas, utilizando linfocitos del donador y suero del receptor; sujetos con infecciones de VIH; sujetos con tuberculosis activa que requieren tratamientos dentro de los 3 años previos, u otros criterios expedidos por la United Network of Organ Sharing (UNOS). Un ejemplo de los posibles criterios extendidos para un donador y/o el riñón del donador incluyen al menos 1 de los siguientes criterios extendidos para la donación de órganos: a) edad del donador $\geq$ 60 años O; b) edad del donador entre 50-59 años y 1 de los siguientes: (i) Accidente cerebrovascular (CVA) + hipertensión + SCr > 1.5 mg/dl O (ii) hipertensión O (iii) CVA + Scr > 1.5 mg/dl O (iv) hipertensión + Scr > 1.5 mg/dl O c) CIT $\geq$ 24 horas, edad del donador > 10 años O d) donador con muerte cardiaca (donador de corazón sin latido).

La presente invención también proporciona métodos para inhibir la enfermedad del sujeto hospedero contra el injerto. Este método comprende administrar al sujeto una molécula mutante de CTLA4 soluble de la invención, sola o conjuntamente, con ligandos adicionales, reactivos con IL-2, IL-4, o γ-interferón. Por ejemplo, una molécula mutante de CTLA4 soluble de esta invención puede ser administrada a un receptor de un trasplante de médula ósea para inhibir la alorreactividad de las células T del donador.

Alternativamente, las células T del donador dentro de un injerto de médula ósea pueden ser toleradas con respecto a los aloantígenos del receptor ex vivo previo al trasplante.

Las moléculas mutantes de CTLA4 solubles de la invención, por ejemplo L104EA29Y, pueden ser administradas como el único ingrediente activo o junto con uno o más de otros fármacos en regímenes de inmunomodulación u otros agentes anti-inflamatorios, por ejemplo, para el tratamiento, prevención o inhibición del rechazo agudo o crónico del aloinjerto o xenoinjerto, o para inducir la tolerancia. Por ejemplo, puede ser utilizado en combinación con un inhibidor de calcineurina, por ejemplo ciclosporina A o FK506; un macrólido inmunosupresor, por ejemplo tacrolimus, rapamicina o un derivado de la misma, por ejemplo 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, centica; un agente guiador de los linfocitos, por ejemplo FTY720 o un análogo del mismo; FK778, Jak-3, corticosteroides; ciclofosfamida, azatiopreno; metotrexato; leflunomida o un análogo de la misma; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato mofetilo; 15-desoxiespergualina o un análogo de la misma; anticuerpos monoclonales e inmunosupresores, (por ejemplo, basiliximab, daclizumab), ligandos, anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos de los mismos para los receptores de los leucocitos, por ejemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD 11a/CD18, CD7, CD25, CD 27, B7, CD40, CD45, CD58, CD 137, ICOS, CD 150

(SLAM), OX40, 4-1BB o sus ligandos; u otros compuestos inmunomoduladores, por ejemplo CTLA4/CD28-Ig, u otros inhibidores de la molécula de adhesión, por ejemplo mAbs o inhibidores de peso molecular bajo, incluyendo antagonistas de LFA-1, antagonistas de selectina y antagonistas de VLA-4. El compuesto es particularmente útil en combinación con un compuesto que interfiere con CD40 y su ligando (por ejemplo anticuerpos para CD40 y anticuerpos para CD40-L), tal como Chi220 (Patente US 6,051,228)), por ejemplo, en las indicaciones descritas anteriormente, por ejemplo, la inducción de la tolerancia.

En donde las moléculas mutantes de CTLA4 solubles de la invención sean administradas conjuntamente con otras terapias inmunosupresoras/inmunomoduladoras, por ejemplo como se ejemplificó aquí, las dosificaciones del inmunosupresor co-administrado, o el compuesto inmunomodulador variará, por supuesto, dependiendo del tipo de co-fármaco empleado, por ejemplo, si el mismo es un esteroide o una ciclosporina, sobre el fármaco específico empleado, sobre la condición que es tratada y etcétera.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona, además, combinaciones terapéuticas, por ejemplo un kit, por ejemplo para su uso en cualquier método como se definió anteriormente, que comprende un L104EA29YIg, en la forma libre o en una forma de sal farmacéuticamente

aceptable, para ser utilizada concomitantemente o en secuencia con al menos una composición farmacéutica que comprende un fármaco inmunosupresor, inmunomodulador o antiinflamatorio. El kit puebe comprender instrucciones para su administración.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona en un aspecto todavía adicional, métodos como se definieron anteriormente que comprenden la co-administración, por ejemplo concomitantemente o en secuencia, de una dosis efectiva terapéuticamente de la molécula mutante de CTLA4 soluble de la invención, con agentes inmunosupresores. Los agentes inmunosupresores incluyen gp39 soluble (también conocido como ligando de CD40 (CD40L), CD154, T-BAM, TRAP), CD29 soluble, CD40 soluble, CD80 soluble (por ejemplo, ATCC 68627), CD86 soluble, CD28 soluble (por ejemplo 68628), CD56 soluble, Thy-1 soluble, CD3 soluble, TCR soluble, VLA-4 soluble, VCAM-1 soluble, LECAM-1 soluble, ELAM-1 soluble, Cd44 soluble, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con gp39 (por ejemplo ATCCHB-10916, ATCC 11B-12055 y ATCC HB-12056), ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con CD40 (por ejemplo ATCC HB-9110), ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con B7 (por ejemplo ATCC HB-253, ATCC CRL-2223, ATCC CRL-2226, ATCC IIB-301, ATCC HB-11341, etc.), ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos

con CD28 (por ejemplo ATCC HB-11944 o mAb 9.3 como se describió por Martín et al (J. Clin. Immun. 4(1):18-22, 1980), ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con LFA-1 (por ejemplo ATCC HB-9579 y ATCC TIB-213), ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con LFA-2, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con IL-2 o IL-2R, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con IL-12, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con IFN-gamma, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con CD2, ligandos de anticuerpos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con CD48, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con cualquier ICAM (por ejemplo, ICAM-1 (ATCC CRL-2252), ICAM-2 e ICAM-3), ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con CTLA4 (por ejemplo ATCC HB-304), ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con Thy-1, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con CD56, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con CD3, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con CD29, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con TCR, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con VLA-4, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con VCAM-1, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos

reactivos con LECAM-1, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con ELAM-1, ligandos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos reactivos con CD44. En ciertas modalidades, los anticuerpos monoclonales son preferidos. En otras modalidades, los fragmentos de anticuerpos son preferidos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen pero no están limitados a Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, scFv y anticuerpos del dominio (dAbs) incluyendo pero sin estar limitados a aquellos descritos en WO2006/030220. Como lo entenderán las personas expertas en el arte fácilmente, la combinación puede incluir las moléculas mutantes de CTLA4 solubles de la invención y otro agente inmunosupresor, las moléculas mutantes de CTLA4 solubles con otros dos agentes inmunosupresores, las moléculas de CTLA4 solubles con otros tres agentes inmunosupresores, etc. La determinación de la combinación y las dosificaciones óptimas pueden ser determinadas y optimizadas utilizando los métodos bien conocidos en el arte.

Una combinación particularmente útil es L104EA29YIg o una composición farmacéutica de la misma con un compuesto que interfiere con IL-2 y su ligando, específicamente un agonista de IL-2R ubicado como antagonista (alfa) el cual es expresado selectivamente sobre la superficie de los linfocitos T activados. Un compuesto que se aglutina a IL-2R (alfa) inhibe competitivamente la activación mediada por IL-2 de los

linfocitos, la cual es una ruta crítica en la respuesta inmune celular involucrada en el rechazo del aloinjerto.

Algunas combinaciones específicas incluyen las siguientes: L104EA29YIg y anticuerpos monoclonales de CD80 (mAbs); L104EA29YIg y CD86 mAbs; L104EA29YIg, CD80 mAbs, y CD86 mAbs; L104EA29YIg y gp39 mAbs; L104EA29YIg y CD40 mAbs; L104EA29YIg y CD28 mAbs; L104EA29YIg, CD80 y CD86 mAbs; y gp39 mAbs, L104EA29YIg CD80 y CD86 mAbs y CD40 mAbs; y L104EA29YIg, anti-LFA1 mAb, y anti-gp39 mAb. Un ejemplo específico de un gp39 mAb es MR1. Otras combinaciones serán fácilmente apreciadas por la persona experta en el arte.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona en un aspecto todavía adicional, métodos como se definieron anteriormente que comprenden la co-administración, por ejemplo concomitantemente o en secuencia, de una dosis terapéuticamente efectiva de la molécula mutante de CTLA4 soluble de la invención, con un agente adjunto y/o un corticosteroide. La meta es reemplazar los inhibidores de calcineurina tóxicos con las moléculas mutantes de CTLA4 de la invención. Sin embargo, las moléculas mutantes de CTLA4 de la invención también pueden ser co-administradas con CNIs tales como la ciclosporina (Neoral®, Sandimmune® de Novartis) y la tacrolimus (FK506, Prograf® de Fujisawa).

Los ejemplos de los agentes adjuntos incluyen pero no están limitados a inhibidores del monofosfato de inosina de

deshidrogenasa (IMPDH), por ejemplo micofenolato mofetilo (MMF, Cellcept® de Roche Laboratories) y ácido micofenólico (Myfortic® de Novartis); rapamicina (sirolimus, Rapamune® de Wyeth/Ayerst); azatioprina (genérico); un agente de guía de los linfocitos, por ejemplo FTY720 (de Novartis); FK778 (de Fujisawa); Jak-3 (de Pfizer); y Certican® (everolimus de Novartis).

Los ejemplos de los corticosteroides incluyen pero no están limitados a, betametasona, budesonida, cortisol, cortisona, dexametasona, hidrocritisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona.

Las combinaciones de co-administración típicas incluyen pero no están limitadas a L104EA29YIg y al menos un agente adjunto seleccionado del grupo listado anteriormente; L104EA29YIg y al menos un corticosteroide seleccionado del grupo listado anteriormente; L104EA29YIg, MMF (Cellcept de Roche) y un corticosteroide seleccionado del grupo listado anteriormente, L104EA29YIg, rapamicina (Rapamune de Wyeth/Ayerst) con o sin un corticosteroide seleccionado del grupo listado anteriormente.

Las combinaciones de co-administración descritas anteriormente pueden ser utilizadas con un agente de inducción tales como los anticuerpos monoclonales inmunosupresores, por ejemplo basiliximab (Simulect® de Novartis) y daclizumab (Zenapax® de Roche Labs); o globulina

anti-timocitos (Timoglobulin® de SangStat). Por ejemplo las combinaciones adecuadas incluyen pero no están limitadas a basiliximab (Simulect® de Novartis) con L104EA29YIg, MMF (Cellcept de Roche) y prednisolona; o daclizumab (Zenapax® de Roche Labs), L104EA29YIg y rapamicina (sirolimus, Rapamune® de Wyeth/Ayerst).

Típicamente, las dosificaciones estándares y el régimen de administración de los fármacos co-administrados descritos anteriormente no están influidos por la adición de las moléculas mutantes de CTLA4 de la invención al régimen de tratamiento. Sin embargo, una persona experta en el arte puede prescribir dosis mas bajas de los fármacos co-administrados, por ejemplo agentes adjuntos y/o corticosteroides, debido a la incorporación de moléculas mutantes de CTLA4 menos tóxicas de la invención en el régimen del tratamiento.

La información de prescripción puede estar basada en el inserto de empaque para cada fármaco co-administrado. Un corticosteroide puede ser co-administrado con las moléculas o la composición farmacéutica de la invención. Por ejemplo, los sujetos pueden ser tratados diariamente con corticosteroides. Una estrategia de reducción y mantenimiento de esteroides puede incluir 500 mg i.v. de metilprednisolona a la llegada a la sala de operaciones (OR), 250 mg i.v. de metilprednisolona el día 2, seguido por prednisona (o

prednisolona), 100 mg oralmente el día 3, seguido por una reducción de la prednisona (o prednisolona) hasta 20 - 30 mg/día al final de la semana 2, seguido por una reducción de prednisona (o prednisolona) hasta un valor inferior que 2.5 mg/kg hasta el mes 6. Los sujetos pueden permanecer en al menos 2.5 mg/día en todo el curso de su tratamiento.

Los fármacos co-administrados adicionales pueden incluir micofenolato mofetilo (MMF). Típicamente, el MMF es administrado en 2 dosis divididas en un programa consistente con relación al tiempo del día y los alimentos. Un ejemplo del régimen de administración para MMF incluye 2 g diariamente. La primera dosis puede ser administrado pre-operativamente. Las dosis subsiguientes pueden ser administradas p.o. tan pronto como el sujeto sea capaz de tolerar medicaciones por la boca. La dosis y el programa pueden ser ajustados con base en los valores de laboratorio (por ejemplo, WBCs reducidos) y la capacidad de tolerancia del sujeto. El inserto del empaque proporciona la información de prescripción total.

Otro fármaco co-administrado puede incluir basiliximab. El basiliximab reconstituido (20 mg en 5 ml) puede ser diluido hasta un volumen de 50 ml con solución salina normal o dextrosa al 5 % y administrado como una infusión i.v. durante20-30 minutos. La primera dosis de 20 mg puede ser administrada el día 1 (el día del trasplante). La segunda

dosis de 20 mg puede ser administrada el día 5. El inserto del empaque proporciona la información de prescripción total.

Se proporcionan además combinaciones terapéuticas, por ejemplo un kit, por ejemplo para su uso en cualquier método como se definió anteriormente, que comprende un L104EA29YIg, en la forma libre o en una forma de sal farmacéuticamente aceptable, que va a ser utilizada concomitantemente o en secuencia con al menos una composición farmacéutica que comprende un agente adjunto y corticosteroides. El kit puede comprender instrucciones para su administración.

La etiqueta y las instrucciones pueden indicar que la composición farmacéutica puede ser utilizada sola, o en combinación, de manera concomitante o en secuencia con un segundo agente para tratar una condición de elección, por ejemplo, enfermedades del sistema inmune, enfermedades autoinmunes, enfermedades inmunoproliferativas, trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto como se describieron anteriormente.

La etiqueta puede indicar las dosificaciones apropiadas para las moléculas descritas aquí. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que las dosificaciones para una molécula que es efectiva para bloquear las interacciones de B7 con su ligando y/o para el tratamiento de una enfermedad del sistema inmune pueden estar basadas en el peso corporal, y los regímenes de administración pueden ser dictados por los perfiles reducidos

del suero objetivo. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que las concentraciones en el suero reducidas objetivo, efectivas, de las moléculas mutantes de CTLA4 descritas aquí para tratar una enfermedad del sistema inmune pueden estar entre aproximadamente 0.2 µg/ml y aproximadamente 30 µg/ml. Alternativamente, la etiqueta puede indicar que las moléculas mutantes de CTLA4 descritas aquí pueden ser administradas en una cantidad entre aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 20.0 mg/kg de peso del paciente para tratar las enfermedades del sistema inmune.

MÉTODOS PARA PRODUCIR LAS MOLÉCULAS DE LA INVENCIÓN

La expresión de las moléculas mutantes de CTLA4 pueden ser células procarióticas. Los procariotas más frecuentemente están representadas por varias cepas de bacterias. Las bacterias pueden ser gram-positivas o gram- negativas. Típicamente, se prefiere una bacteria gram-negativa tal como E. Coli. Otras cepas microbianas también pueden ser utilizadas.

Las secuencias que codifican las moléculas mutantes de CTLA4 pueden ser insertadas en un vector diseñado para expresar secuencias extrañas en células procarióticas tales como E. coli. Estos vectores pueden incluir secuencias de control procarióticas utilizadas comúnmente las cuales están definidas aquí para incluir promotores para el inicio de la transcripción, opcionalmente con un operador, en compañía de

las secuencias del sitio de aglutinación del ribosoma, que incluyen promotores tales como los usados comúnmente, como la beta-lactamasa (penicilinasa) y los sistemas promotores de lactosa (lac) (Chang, et al., (1997) Nature 198:1056), el sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel, et al., (1980) Nucleic Acids Res. 8:4057) y el promotor P_L derivado de lambda y el sitio de aglutinación del ribosoma del gen N (Shimatake, et al., (1981) Nature 292:128).

Tales vectores de la expresión también incluirán los orígenes de replicación y marcadores seleccionables, tales como una beta-lactamasa o un gen de neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a los antibióticos, de modo que los vectores puedan replicarse en las bacterias y las células que llevan los plásmidos puedan ser seleccionadas para el crecimiento en la presencia de antibióticos, tales como ampicilina o kanamicina.

El plásmido de la expresión puede ser introducido en las células procarióticas por medio de una variedad de métodos estándares, incluyendo pero sin estar limitado a, el choque con $CaCl_2$ (Cohen, (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110, y Sambrook et al. (eds.), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2a. edición, Cold Spring Harbor Press, (1989)) y electroporación.

De acuerdo con la práctica de la invención, las células eucarióticas también son células hospederas adecuadas. Los

ejemplos de las células eucarióticas incluyen cualquier célula animal, ya sea primaria o inmortalizada, levadura (por ejemplo, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, y Pichia pastoris), y células vegetales. Las células del mieloma, COS y CHO son ejemplos de células animales que pueden ser utilizadas como elementos hospederos. Las células de CHO particulares incluyen, pero no están limitadas a, DG44 (Chasin, et al., 1986 Som. Cell. Molec. Genet. 12:555-556; Kolkekar 1997 Biochemistry 36:10901-10909), CHO-K1(ATCC No. CCL-61), la línea celular CHO-K1 Tet-On (Clontech), CHO designada como ECACC 85050302 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), el clon 13 de CHO (GIMG, Genova, IT), el clon B de CHO (GEIMG, Genova, IT), CHO-K1/SF designado como ECACC 93061607 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK), y RR-CHOK1 designado como ECACC 92052129 (CAMR, Salisbury, Wiltshire, UK). Las células vegetales ejemplares incluyen las células de tabaco (la planta completa, un cultivo celular, o el callo), maíz, soya, y arroz. Las semillas de maíz, soya y arroz también son aceptables.

Las secuencias de ácidos nucléicos que codifican las moléculas mutantes de CTLA4 también pueden ser insertadas en un vector diseñado para expresar las secuencias extrañas en un elemento hospedero eucariótico. Los elementos reguladores del vector pueden variar de acuerdo con el elemento hospedero eucariótico particular.

Las secuencias de control eucariótico utilizadas comúnmente para su uso en los vectores de expresión, incluyen promotores y secuencias de control compatibles con células de mamífero tales como, por ejemplo, el promotor de CMV (vector CDM8) y el virus del sarcoma de las aves (ASV) (vector πLN). Otros promotores utilizados comúnmente incluyen los promotores inicial y final del virus 40 del simio (SV40) (Fiers, et al., (1973) Nature 273:113), u otros promotores virales tales como aquellos derivados del polioma, el adenovirus 2, y el virus del papiloma del bovino. Un promotor inducible, tal como hMTII (Karin, et al., (1982) Nature 299:797-802) también puede ser utilizado.

Los vectores para expresar las moléculas mutantes de CTLA4 en los eucariotas también pueden llevar secuencias llamadas regiones mejoradoras. Estas son importantes en la optimización de la expresión del gen y son encontradas ya sea corriente arriba o corriente abajo de la región promotora.

Los ejemplos de los vectores de expresión para las células hospederas eucarióticas incluyen, pero no están limitados a, los vectores para las células hospederas mamíferas (por ejemplo, BPV-1, pHyg, pRSV, pSV2, pTK2, (Maniatis); pIRES (Clontech); pRc/CMV2, pRc/RSV, pSFV1 (Life Technologies); vectores pVPakc, vectores pCMV, vectores pSG5 (Stratagene)), vectores retrovirales (por ejemplo, vectores pFB ((Stratagene)), pCDNA-3 (Invitrogen) o formas modificadas

de los mismos, vectores adenovirales, vectores del virus adeno-asociado, vectores de baculovirus, vectores de levadura (por ejemplo, vectores de pESC ((Stratagene)).

Las secuencias de ácido nucléico que codifican las moléculas mutantes de CTLA4 pueden integrarse en el genoma de la célula hospedera eucariótica y replicarse cuando el genoma hospedero se replica. Alternativamente, el vector que lleva las moléculas mutantes de CTLA4 puede contener los orígenes de la replicación que permiten la replicación extracromosómica.

Para la expresión de las secuencias del ácido nucléico en Saccharomyces cerevisiae, el origen de la replicación del plásmido de levadura endógena, el círculo de 2μ puede ser utilizado. (Broach, (1983) Meth. Enz. 101:307). Alternativamente, las secuencias del genoma de levadura capaces de promover la replicación autónoma, pueden ser utilizadas (véase, por ejemplo, Stinchcomb, et al., (1979) Nature 282:39); Tschemper et al., (1980) Gene 10:157; y Clarke et al., (1983) Meth. Enz. 101:300).

Las secuencias de control transcripcional para los vectores de levadura incluyen los promotores para la síntesis de las enzimas glicolíticas (Hess et al., (1968) J. Adv. Enzyme Reg. 7:149; Holland et al., (1978) Biochemistry 17:4900). Los promotores adicionales conocidos en el arte incluyen el promotor de CMV provisto en el vector de CDM8

(Toyama y Okayama, (1990) FEBS 268:217-221); el promotor para la 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman et al., (1980) J. Biol. Chem. 225:2073), y aquellos para otras enzimas glicolíticas.

Otros promotores son inducibles a causa de que los mismos pueden ser regulados por estímulos ambientales o el medio de crecimiento de las células. Estos promotores inducibles incluyen aquellos de los genes de las proteínas para el choque térmico, la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfato ácido, enzimas asociadas con el catabolismo del nitrógeno, y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y galactosa.

Las secuencias reguladoras también pueden ser colocadas en el extremo 3' de las secuencias de codificación. Estas secuencias pueden actuar para estabilizar el ARN mensajero. Tales terminadores son encontrados en la región no traducida 3' siguiendo a las secuencias de codificación en varios genes de mamífero y derivados de la levadura.

Los vectores ejemplares para la plantas y las células vegetales, incluyen, pero no están limitados a, plásmidos de Agrobacterium T_i, virus de mosaico de la coliflor (CaMV), y el virus de mosaico del tomate dorado (TGMV).

Los aspectos generales de las transformaciones del sistema hospedero de la célula de mamífero han sido descritos por Axel (patente US. No. 4,399,216 expedida el 16 de agosto de 1983). Las células de mamífero pueden ser transformadas

por métodos que incluyen pero no están limitados a, la transfección en la presencia del fosfato de calcio, microinyección, electroporación, o por medio de transducción con vectores virales.

Los métodos para introducir las secuencias de ADN extraño en los genomas de las plantas y levadura incluyen: (1) métodos mecánicos, tales como la microinyección del ADN en células o protoplastos únicos, agitación en forma de remolino de las células con perlas de vidrio en la presencia de ADN, o disparo de esferas de tungsteno o de oro recubiertas con el ADN, en las células o protoplastos; (2) introducir el ADN por la fabricación de membranas celulares permeables a las macromoléculas por medio del tratamiento de polietilenglicol o sometiéndolas a impulsos eléctricos de alto voltaje (electroporación); o (3) el uso de liposomas (que contienen el ADNc) que se fusionan a las membranas celulares.

La expresión de las moléculas mutantes de CTLA4 puede ser detectada por los métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, las moléculas mutantes pueden ser detectadas por geles de SDS-PAGE para teñido de Coomasie e inmunotransferencia, utilizando anticuerpos que se aglutinen a CTLA4. La recuperación de la proteína puede ser efectuada utilizando medios de purificación de proteína estándares, por ejemplo, cromatografía de afinidad o cromatografía de

intercambio iónico, para dar un producto substancialmente puro (R. Scopes in: "Protein Purification, Principles and Practice", tercera edición, Springer-Verlag (1994)).

La publicación US de la solicitud de patente US Número 20050019859 y WO 04/058944 enseñan un proceso para la producción de las proteínas de la invención, específicamente productos de glicoproteína recombinante, por cultivos de células animales o de mamíferos y son incorporadas aquí para referencia.

La invención proporciona además moléculas mutantes de CTLA4 solubles, producidas anteriormente aquí.

MUTAGÉNESIS A BASE DEL CODÓN DE CTLA4Ig

En una modalidad, la mutagénesis dirigida al sitio y un procedimiento de selección novedoso fueron utilizados para identificar varias mutaciones en el dominio extracelular de CTLA4 que mejora la afinidad de aglutinación hacia CD86. En esta modalidad, las mutaciones fueron llevadas a cabo en residuos en las regiones del domino extracelular de CTLA4 desde la serina 25 hasta la arginina 33, la hebra C' (alanina 49 y treonina 51), la hebra F (lisina 93, ácido glutámico 95 y leucina 96), y en la región desde la metionina 97 hasta la tirosina 102, la tirosina 103 hasta la glicina 107 y en la hebra G en las posiciones de la glutamina 111, tirosina 113 e isoleucina 115. Estos sitios fueron elegidos con base en los estudios de las proteínas de fusión de CD28/CTLA4 quiméricas

(Peach et al., J. Exp. Med., 1994, 180:2049-2058), y sobre un modelo que predice cuales cadenas laterales del residuo de aminoácidos podrían ser expuestas al solvente, y una falta de identidad u homología del residuo de aminoácidos en ciertas posiciones entre CD28 y CTLA4. También, cualquier residuo que está espacialmente en proximidad estrecha (5 a 20 unidades de Angstrom) con respecto a los residuos identificados, se considera parte de la presente invención.

Para sintetizar y seleccionar las moléculas mutantes de CTLA4 solubles con afinidades alteradas hacia CD80 y/o CD86, se adoptó una estrategia de dos etapas. Los experimentos abarcaron primero, generar una biblioteca de mutaciones en un codón específico de una porción extracelular de CTLA4 y luego, seleccionar estas por el análisis BIAcore para identificar los mutantes con reactividad alterada a CD80 o CD86. El sistema de ensayo de BIAcore (Pharmacia, Piscataway, N. J.) utiliza un sistema detector de resonancia del plasmón superficial que esencialmente involucra el enlace covalente de ya sea CD80Ig o CD86Ig a un chip del sensor recubierto con dextrano que está colocado en un detector. La molécula de prueba puede ser inyectada entonces en la cámara que contiene el chip sensor y la cantidad de proteína complementaria que se aglutina puede ser evaluada con base en el cambio en la masa molecular que está asociada físicamente con el lado recubierto con dextrano del chip del sensor; el cambio en la

masa molecular puede ser medido por el sistema detector.

VENTAJAS DE LA INVENCIÓN

A causa de que la aglutinación de CTLA4 hacia CD80 y CD86 está caracterizada por velocidades de asociación ("encendido") rápidas y velocidades de disociación ("apagado") rápidas, y a causa de que los complejos de CTLA4Ig-CD86 se disocian aproximadamente 5 a 8 veces más rápidamente que los complejos de CTLA4Ig-CD80, se razonó que disminuyendo la velocidad de disociación de CTLA4Ig desde CD80 y/o CD86 podría conducir a moléculas con propiedades inmunosupresoras más potentes. Por consiguiente, las moléculas mutantes de CTLA4 solubles que tienen una afinidad más elevada hacia las células positivas de CD-80 o CD-86 comparado con CTLA4 del tipo silvestre, o las formas no mutadas de CTLA4Ig, se espera que bloqueen la cebadura de las células activadas específicas del antígeno con una eficacia más elevada que el CTLA4 del tipo silvestre o las formas no mutadas de CTLA4Ig.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos son presentados para ilustrar la presente invención y para ayudar a una persona con experiencia ordinaria en el arte en la fabricación y uso de la misma. Los ejemplos no están propuestos de ninguna manera para limitar de otra manera el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

Este ejemplo proporciona una descripción de los métodos utilizados para generar las secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas mutantes de CTLA4 solubles de la invención. Un L104EIg mutante de sitio único fue generado y probado para verificar las características cinéticas de aglutinación hacia CD80 y/o CD86. La secuencia de nucleótidos de L104EIg fue utilizada como un molde para generar la secuencia de CTLA4 mutante de sitio doble, L104EA29YIg, la cual fue probada para verificar las características de aglutinación cinéticas hacia CD80 y/o CD86.

MUTAGÉNESIS A BASE DEL CODÓN DE CTLA4Ig

Una estrategia de selección y mutagénesis fue desarrollada para identificar las moléculas mutantes de CTLA4Ig que tuvieron velocidades más lentas de disociación (velocidades de "apagado") desde las moléculas de CD80 y/o CD86. Las secuencias de nucleótidos mutantes de un solo sitio fueron generadas utilizando CTLA4Ig (patentes U.S. Nos: 5,844,095; 5,851,795; y 5,885,796; acceso del ATCC No. 68629) como un molde. Los cebadores de PCR del oligonucleótido mutagénico fueron diseñados para la mutagénesis aleatoria de un codón de ADNc específico permitiendo cualquier base en las posiciones 1 y 2 del codón, pero solamente la guanina o timina en la posición 3 (XXG/T; también conocida como NNG/T). De esta manera, un codón específico que codifica un

aminoácido podría ser mutado aleatoriamente para codificar cada uno de los 20 aminoácidos. A este respecto, la mutagénesis de XXG/T produce 32 codones potenciales que codifican cada uno de los 20 aminoácidos. Los productos de PCR que codifican las mutaciones en proximidad estrecha con -M97-G107 de CTLA4Ig (véase figura 7, SEC ID NOS: 3 y 4; o figura 8, SEC ID NOS: 5 y 6), fueron digeridas con SacI/XbaI y se subclonaron en el vector de expresión CTLA4Ig πLN cortado de manera semejante (también conocido como piLN). Este método fue utilizado para generar la molécula mutante de CTLA4 de un solo sitio L104EIg (figura 8, SEC ID NOS: 5 y 6).

Para la mutagénesis en proximidad con S25-R33 de CTLA4Ig, un sitio de restricción de NheI inmóvil fue introducido primero 5' con respecto a este bucle, por la mutagénesis dirigida por el cebador de PCR. Los productos de PCR fueron digeridos con NheI/XbaI y se subclonaron en los vectores de expresión de CTLA4Ig o L104EIg cortados de manera semejante. Este método fue utilizado para generar la molécula mutante de CTLA4 de sitio doble L104EA29YIg (figura 7, SEC ID NOS: 3 y 4). En particular, la molécula de ácido nucléico que codifica la molécula mutante de CTLA4 de un solo sitio, L104EIg, fue utilizada como un molde para generar la molécula mutante de CTLA4 de sitio doble, L104EA29YIg. El vector piLN que tiene el L104EA29YIg es mostrado en la figura 12.

EJEMPLO 2

Lo siguiente proporciona una descripción de los métodos de selección utilizados para identificar los polipéptidos de CTLA4 mutantes de un solo sitio y de sitio doble, expresados a partir de las construcciones descritas en el ejemplo 1, que exhibieron una afinidad de aglutinación más elevada hacia los antígenos de CD80 y CD86, comparado con las moléculas de CTLA4Ig no mutadas.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* comunes indican que CTLA4Ig por sí mismo es incapaz de bloquear completamente la cebadura de las células T activadas, específicas del antígeno. Los estudios in vitro con CTLA4Ig y cualquier anticuerpo monoclonal específico para CD80 o CD86 que miden la inhibición de la proliferación de las células T, indican que el anticuerpo monoclonal anti-CD80 no aumenta la inhibición de CTLA4Ig. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal anti-CD86 aumentó la inhibición, indicando que CTLA4Ig no fue tan efectivo para bloquear las interacciones de CD86. Estos datos apoyan los descubrimientos iniciales por Linsley et al. (Immunity, (1994), 1:793-801) que muestran que la inhibición de las respuestas celulares mediadas por CD80 requirió concentraciones de CTLA4Ig aproximadamente 100 veces más bajas que para las respuestas mediadas de CD86. Basado en estos descubrimientos, se supuso que las moléculas mutantes de CTLA4 solubles que tienen una afinidad más elevada hacia

CD86 que CTLA4 del tipo silvestre, deben ser capaces de una manera mejorada de bloquear la cebadura de las células activadas específicas del antígeno que CTLA4Ig.

Para este fin, las moléculas mutantes de CTLA4 solubles descritas en el ejemplo 1 anterior fueron seleccionadas utilizando un procedimiento novedoso de selección para identificar las diversas mutaciones en el dominio extracelular de CTLA4 que mejoren la afinidad de aglutinación hacia CD80 y CD86. Esta estrategia de selección proporcionó un método efectivo para identificar directamente los mutantes con velocidades de "apagado" aparentemente más lentas sin la necesidad de la purificación o cuantificación de la proteína, puesto que la determinación de la velocidad de "apagado" es independiente de la concentración (O'Shannessy et al., (1993) Anal. Biochem., 212:457-468).

Las células de COS fueron transfectadas con el ADN del plásmido purificado por miniprep individual y se propagó durante varios días. El medio de cultivo acondicionado de 3 días fue aplicado a los chips biosensores BIAcore (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia), recubiertos con CD80Ig o CD86Ig solubles. La aglutinación y disociación específica de las proteínas mutantes fue medida por resonancia del plasmón superficial (O'Shannessy, D. J., et al., (1993) Anal. Biochem., 212:457-468).Todos los experimentos fueron corridos sobre biosensores BIAcore™ o BIAcore™ 2000 a 25 °C. Los

ligandos fueron inmovilizados sobre los chips del sensor de grado NCM5 de investigación (Pharmacia) utilizando la unión de N-etil-N'-(dimetilaminopropilo)carbodiimidN-hidroxisuccinimida (Johnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277; Khilko, S. N., et al. (1993) J. Biol. Chem. 268:5425-15434).

Método de selección

Las células COS que crecieron en placas de cultivo del tejido de 24 cavidades, fueron transfectadas transitoriamente con el ADN que codifica el CTLA4Ig mutante. El medio de cultivo que contiene el CTLA4Ig mutante soluble, secretado, fue colectado 3 días más tarde.

El medio de cultivo de las células COS acondicionado se dejó fluir sobre los chips biosensores BIAcore derivados con CD86Ig o CD80Ig (como se describió en Greene et al., 1996 J. Biol. Chem. 271:26762-26771), y las moléculas mutantes fueron identificadas con velocidades de "apagado" más lentas que aquellas observadas para CTLA4Ig del tipo silvestre. Los cADNs correspondientes a las muestras del medio seleccionado fueron secuenciados y el ADN fue preparado para efectuar la transfección transitoria de las células COS a escala más grande, a partir de las cuales la proteína de CTLA4Ig mutante fue preparada después de la purificación de la proteína A del medio de cultivo.

Las condiciones del análisis de BIAcore y el análisis de

los datos de aglutinación en el equilibrio fueron efectuados como se describió en J. Greene et al., 1996 J. Biol. Chem. 271:26762-26771, y como se describe aquí.

Análisis de datos BIAcore

Las líneas base del aparato Senosorgram fueron normalizadas a unidades de respuesta cero (RU) previo al análisis. Las muestras fueron corridas sobre células de flujo derivadas por imitación para determinar los valores de la unidad de respuesta base (RU) debido a las diferencias del índice de refracción volumétrico entre las soluciones. Las constantes de disociación en el equilibrio (K_d) fueron calculadas de las gráficas de R_{eq} contra C, en donde R_{eq} es la respuesta en estado permanente menos la respuesta sobre un chip derivado por imitación, y C es la concentración molar del analito. Las curvas de aglutinación fueron analizadas utilizando un software de ajuste de la curva no lineal, comercial (Prism, GraphPAD Software).

Los datos experimentales fueron ajustados primero a un modelo para un ligando único que se aglutina a un solo receptor (modelo de 1 sitio, es decir, un sistema de Langmuir simple, A+B↔AB), y las constantes de asociación en el equilibrio (K_d=[A]*[B]/[AB]) fueron calculados a partir de la ecuación $R=R_{max}*C/(K_d+C)$. Subsiguientemente, los datos fueron ajustados al modelo de dos sitios más simple de la aglutinación del ligando (es decir, a un receptor que tiene

dos sitios de aglutinación independientes que no interactúan, como se describe por la ecuación $R=R_{max1}*C/(K_{d1}+C)+R_{max2}*C/(K_{d2}+C))$.

La bondad de los ajustes de estos dos modelos fue analizada visualmente por la comparación con los datos experimentales y estadísticamente por una prueba de F de la suma de los cuadrados. El modelo de un sitio más simple fue elegido como el mejor ajuste, a menos que el ajuste del modelo de dos sitios fuera significativamente mejor ($p<0.1$).

Los análisis de asociación y disociación fueron efectuados utilizando el software de evaluación 2.1 de BIA (Pharmacia). Las constantes de la velocidad de asociación k_{on} fueron calculadas de dos maneras, suponiendo tanto las interacciones de un solo sitio, homogéneas, como las interacciones de dos sitios, paralelas. Para interacciones de un solo sitio, los valores de k_{on} fueron calculados de acuerdo con la ecuación $R_t=R_{eq}(1-exp^{-ks(t-t_0)})$, en donde R_t es una respuesta en un tiempo dado, t; R_{eq} es la respuesta en estado permanente; t_0 es el tiempo al inicio de la inyección; y $k_s=dR/dt=k_{on}\bullet Ck_{off}$, y en donde C es una concentración del analito, calculada en términos de los sitios de aglutinación monomérica. Para las interacciones de dos sitios, los valores de k_{on} fueron calculados de acuerdo con la ecuación $R_t=R_{eq1}(1-exp^{-ks1(t-t_0)})+R_{eq2}(1-exp^{ks2(t-t_0)})$. Para cada modelo, los valores de k_{on} fueron determinados de la pendiente calculada (hasta

aproximadamente 70 % de asociación máxima) de las gráficas de k_s contra C.

Los datos de disociación fueron analizados de acuerdo con los modelos de un sitio (AB=A+B) o los modelos de dos sitios (AiBj=Ai+Bj), y las constantes de la velocidad (k_{off}) fueron calculadas de las curvas del mejor ajuste. El modelo del sitio de aglutinación fue utilizado excepto cuando los residuos fueron mayores que la base de la máquina (2-10 RU, de acuerdo con la máquina), en tal caso, el modelo de aglutinación de dos sitios fue utilizado. Los tiempos promedio de ocupación del receptor fueron calculados utilizando la relación $t_{1/2}=0.693/k_{off}$.

Citometría de flujo:

El mAb L307.4 de murino (anti-CD80) fue comprado de Becton Dickinson (San Jose, California) e IT2.2 (anti-B7-0 [también conocido como CD86]), de Pharmingen (San Diego, California). Para inmunoteñido, las células de CHO positivas a CD80 y/o positivas a CD86 fueron removidas de sus recipientes de cultivo por incubación en una solución salada amortiguada con fosfato (PBS) que contiene EDTA 10 mM. Las células de CHO (1-10 x 10^5) fueron incubadas primero con mAbs o proteínas de fusión de inmunoglobulina en DMEM que contienen 10 % del suero de bovino fetal (FBS), luego se lavan y se incuban con reactivos de la segunda etapa de inmunoglobulina anti-ratón o anti-humana, de cabra, conjugada

con isotiocianato de fluoresceína (Tago, Burlingame, California). A las células se les dio un lavado final y se analizaron sobre un aparato FACScan (Becton Dickinson).

Cromatografía de SDS-PAGE y de exclusión de tamaño

SDS-PAGE fue efectuado sobre geles de acrilamida al 4-20 % de Tris/glicina (Novex, San Diego, CA). Los geles analíticos fueron teñidos con azul del Coomassie, y las imágenes de los geles húmedos fueron obtenidas por exploración digital. CTLA4Ig (25 µg) y L104EA29YIg (25 µg) fueron analizados por cromatografía de exclusión de tamaño utilizando una columna TSK-GEL G300 SW_{XL} (7.8 x 300 mm, Tosohaas, Montgomeryville, PA) equilibrada en una solución salina amortiguada con fosfato que contiene NAN_3 al 0.02 % a una velocidad de flujo de 1.0 ml/minuto.

$CTLA4X_{C120S}$ y $L104EA29YX_{C120S}$.

El $CTLA4X_{C120S}$ de cadena sencilla fue preparado como se describió previamente (Linsley et al, (1995) J. Biol Chem. 270:15417-15424). Brevemente, un plásmido de expresión de oncostatina M CTLA4 (OMCTLA4) fue utilizado como un molde, el cebador delantero,

GAGGTGATAAAGCTTCACCAATGGGTGTACTGCTCACACAG

fue elegido para igualar las secuencias en el vector; y el cebador inverso,

GTGGTGTATTGGTCTAGATCAATCAGAATCTGGGCACGGTTC

correspondió a los últimos siete aminoácidos (es decir

los aminoácidos 118-124) en el dominio extracelular de CTLA4, y contuvo un sitio de la enzima de restricción, y un codón de detención (TGA). El cebador inverso especificó una mutación C120S (cisteína a serina en la posición 120). En particular, la GCA de la secuencia de nucleótidos (nucleótidos 34-36) del cebador inverso mostrado anteriormente es reemplazado con una de las siguientes secuencias de nucleótidos: AGA, GGA, TGA, CGA, ACT, o GCT. Como lo entenderán las personas expertas en el arte, la secuencia de nucleótidos GCA es una secuencia complementaria inversa del codón TGC para la cisteína. De manera semejante, las secuencias de nucleótidos AGA, GGA, TGA, CGA, ACT o GCT son las secuencias complementarias inversas de los codones para la serina. Los productos de reacción en cadena de la polimerasa fueron digeridos con HindIII/XbaI y se subclonaron direccionalmente en el vector de expresión πNL (Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ.). L104EA29YX$_{C120S}$ fue preparado de una manera idéntica. Cada construcción fue verificada por secuenciación del ADN.

Identificación y caracterización bioquímica de los mutantes de afinidad elevada

Veinticuatro aminoácidos fueron elegidos para la mutagénesis y las ~2300 proteínas mutantes resultantes, ensayadas para la aglutinación de CD86Ig por resonancia del plasmón superficial (SPR; como se describió, supra). Los efectos predominantes de la mutagénesis en cada sitio son

resumidos en la tabla II. La mutagénesis al azar de algunos aminoácidos en el S25-R33 aparentemente no alteró la aglutinación del ligando. La mutagénesis de E31 y R33 y los residuos M97-Y102 aparentemente condujeron a una aglutinación reducida del ligando. La mutagénesis de los residuos, S25, A29, y T30, K93, L96, Y103, L104 y G105, condujo a proteínas con velocidades de "encendido" lentas y/o de "apagado" lentas. Estos resultados confirman los descubrimientos previos de que los residuos en la región S25-R33, y los residuos en o cerca de M97-Y102 tienen influencia en la aglutinación del ligando (Peach et al., (1994) J. Exp. Med., 108:2049-2058.

La mutagénesis de los sitios S25, T30, K93, L96, Y103, y G105 condujeron a la identificación de algunas proteínas mutantes que tuvieron una velocidad de "apagado" más lenta de CD86Ig. Sin embargo, en estos casos, la velocidad de "apagado" lenta estuvo comprometida por una velocidad de "encendido" lenta que conduce a proteínas mutantes con una afinidad total hacia CD86Ig que fue aparentemente semejante a aquella observada con el CTLA4Ig del tipo silvestre. Además, la mutagénesis de K93 condujo a una agregación significativa que puede haber sido responsable de los cambios cinéticos observados.

La mutagénesis aleatoria de L104 seguido por la transfección de las células COS y la selección por SPR de las

muestras del medio de cultivo sobre CD86Ig inmovilizado produjo seis muestras del medio que contienen proteínas mutantes con velocidades de "apagado" aproximadamente 2 veces más lentas que el CTLA4Ig del tipo silvestre. Cuando el ADNc correspondiente de estos mutantes fue secuenciado, cada uno se encontró que codifica una mutación de leucina al ácido glutámico (L104E). Aparentemente, la substitución de leucina 104 al ácido aspártico (L104D) no afectó la aglutinación de CD86Ig.

La mutagénesis fue repetida entonces en cada sitio listado en la Tabla II, este tiempo utilizando L104E como el molde del PCR en lugar del CTLA4Ig del tipo silvestre, como se describió anteriormente. El análisis de SPR, nuevamente utilizando CD86Ig inmovilizado, identificó seis muestras del medio de cultivo de la mutagénesis de la alanina 29 con proteínas que tienen velocidades de "apagado" aproximadamente 4 veces más lentas que CTLA4Ig del tipo silvestre. Los dos más lentos fueron las substituciones de tirosina (L104EA29Y), dos fueron de leucina (L104EA29L), uno fue de triptófano (L104E29W), y uno fue de treonina (L104EA29T). Aparentemente, los mutantes de la velocidad de "apagado" no lenta fueron identificados cuando la alanina 29 fue mutada aleatoriamente, sola, en

CTLA4Ig del tipo silvestre.

La masa molecular relativa y el estado de agregación de L104E purificado y L104EA29YIg fueron evaluados por SDS-PAGE y la cromatografía de exclusión de tamaño. L104EA29YIg (~1 µg; banda 3) y L104EIg (~1 µg; banda 2) aparentemente tuvieron la misma movilidad electroforética que CTLA4Ig (~1 µg; banda 1) bajo condiciones reductoras (~50 kDa; +8ME; más 2-mercaptoetanol) y no reductoras (~100 kDa; -8ME) (figura 10A). La cromatografía por exclusión de tamaño demostró que L104EA29YIg (Figura 10C) aparentemente tuvo la misma movilidad que el CTLA4Ig dimérico (figura 10B). Los picos principales representan el dímero de la proteína mientras que el pico menor que eluye más rápido en la figura 10B representa agregados de peso molecular más elevado. Aproximadamente 5.0 % de CTLA4Ig estuvo presente como agregados de peso molecular más elevado pero no mostró evidencia de agregación de L104EA29YIg o L104EIg. Por lo tanto, la aglutinación más fuerte a CD86Ig observada con L104EIg y L104EA29YIg podría no ser atribuida a la agregación inducida por mutagénesis.

Análisis de Equilibrio y Aglutinación Cinética

Los análisis de equilibrio y aglutinación

cinética fueron efectuados sobre CTLA4Ig purificado con la proteína A, L104EIg, y L104EA29YIg utilizando la resonancia del plasmón superficial (SPR). Los resultados son mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1: Constantes Cinéticas de Equilibrio y Aparentes

Proteína inmovilizada	Analito	k_{on} (x 10^5) M^{-1} S^{-1}	k_{off} (x 10^{-3}) S^{-1}	K_d nM
CD80Ig	CTLA4Ig	3.44 ± 0.29	2.21 ± 0.18	6.51 ± 1.08
CD80Ig	L104EIg	3-02 ± 0.05	1.35 ± 0.08	4.47 ± 0.36
CD80Ig	L104EA29YIg	2.96 ± 0.20	1.08 ± 0.05	3.66 ± 0.41
CD80Ig	$CTLA4X_{C120S}$	12.0 ± 1.0	230 ± 1.0	195 ± 25
CD80Ig	$L104EA29YX_{C120S}$	8.3 ± 0.26	71 ± 5	85.0 ± 2.5
CD86Ig	CTLA4Ig	5.95 ± 0.57	8.16 ± 0.52	13.9 ± 2.27
CD86Ig	L104EIg	7.03 ± 0.22	4.26 ± 0.11	6.06 ± 0.05
CD86Ig	L104EA29YIg	6.42 ± 0.40	2.06 ± 0.03	3.21 ± 0.23
CD86Ig	$CTLA4X_{C120S}$	16.5 ± 0.5	8.40 ± 55	511 ± 17
CD86Ig	$L104EA29YX_{C120S}$	11.4 ± 1.6	300 ± 10	267 ± 29

(los valores son el promedio de la desviación estándar de tres experimentos diferentes)

Las constantes de disociación en el equilibrio observadas (K_d; Tabla I) fueron calculadas de las curvas de aglutinación generadas sobre una gama de concentraciones (5.0-200 nM). L104EA29YIg se aglutina más fuertemente a CD86Ig que lo que lo hace L104EIg o CTLA4Ig. La K_d inferior de L104EA29YIg (3.21 nM) que L104EIg (6.06 nM) o CTLA4Ig (13.9 nM) indica una afinidad de aglutinación más elevada de L104EA29YIg a CD86Ig. La K_d inferior de L104EA29YIg (3.66 nM)

que L104EIg (4.47 nM) o CTLA4Ig (6.51 nM) indica una afinidad de aglutinación más elevada de L104EA29YIg a CD80Ig.

El análisis de aglutinación cinética reveló que las velocidades de "encendido" comparativas para CTLA4Ig, L104EIg, y L104EA29YIg que se aglutinan a CD80 fueron semejantes, como lo fueron las velocidades de "encendido" para CD86Ig (Tabla I). Sin embargo, las velocidades de "apagado" para estas moléculas no fueron equivalentes (Tabla I). Comparado con CTLA4Ig, L104EA29YIg tuvieron una velocidad de "apagado" aproximadamente 2 veces más lenta desde CD80Ig, y una velocidad de "apagado" aproximadamente 4 veces más lenta desde CD86Ig. L104E tuvo velocidades de "apagado" intermedias entre L104EA29YIg y CTLA4Ig. Puesto que la introducción de estas mutaciones no afectó significativamente las velocidades de "encendido", el incremento en la afinidad para CD80Ig y CD86Ig observado con L104EA29YIg fue probablemente de manera principal debido a una reducción en las velocidades de "apagado".

Para determinar si el incremento en la afinidad de L104EA29YIg hacia CD86Ig y CD80Ig fue debido a las mutaciones que afectan la manera en cada monómero asociado como un dímero, o si existieron cambios estructurales mejoradores de la afinidad introducidos en cada monómero, las construcciones de cadena sencilla de los dominios extracelulares de CTLA4 y L104EA29Y fueron preparados después de la mutagénesis de la

cisteína 120 a la serina como se describió supra y por Linsley et al., (1995) J. Biol. Chem., 270:15417-15424. Las proteínas purificadas de $CTLA4X_{C120S}$ y $L104EA29YX_{C120S}$ se mostró que van a ser monoméricas por cromatografía de permeación de gel (Linsley et al., (1995), supra), antes que sus propiedades de aglutinación del ligando fueron analizadas por SPR. Los resultados mostraron que la afinidad de aglutinación de ambas proteínas monoméricas para CD86Ig fueron aproximadamente 35-80 veces menor que aquella observada para sus dímeros respectivos (Tabla I). Esto soporta los datos publicados previamente que establecen que la dimerización de CTLA4 fue requerida para la aglutinación del ligando con una afinidad elevada (Greene et al, (1996) J. Biol. Chem., 271:26762-26771).

$L104EA29YX_{C120S}$ se unió con una afinidad más elevada que aproximadamente 2 veces que $CTLA4X_{C120S}$ a tanto CD80Ig como CD86Ig. La afinidad incrementada fue debida a una velocidad aproximadamente 3 veces más lenta de disociación desde ambos ligandos. Por lo tanto, la aglutinación del ligando más fuerte por L104EA29Y fue más probablemente debido a los cambios estructurales que mejoran la afinidad que han sido introducidos en cada cadena monomérica en lugar de las alteraciones en las cuales la molécula se dimerizó.

Análisis Estructural y del Sitio de las Mutaciones Mejoradoras de la Afinidad

La estructura de la solución del dominio semejante a IgV extracelular de CTLA4 ha sido determinada recientemente por espectroscopia de RMN (Metzler et al, (1997) Nature Struct. Biol., 4:527-531. Esto permitió la localización exacta de la leucina 104 y la alanina 29 en el pliegue tridimensional (Fig. 11). La leucina 29 está situada cerca del extremo C-terminal de la región de S25-R33, la cual está espacialmente adyacente a la región de MYPPPY. Aunque existe una interacción significativa entre los residuos en la base de estas dos regiones, aparentemente no existe interacción directa entre L104 y A29 aunque los mismos comprenden ambos una parte de un núcleo hidrofóbico contiguo en la proteína. Las consecuencias estructurales de los dos mutantes mejoradores de la afinidad fueron evaluadas por modelación. La mutación A29Y puede ser acomodada fácilmente en la hendidura entre la región S25-R33 y la región MYPPPY, y puede servir para estabilizar la conformación de la región de MYPPPY. En el CTLA4 del tipo silvestre, L104 forma interacciones hidrofóbicas extensas con L96 y V94 cerca de la región de MYPPPY. Es altamente improbable que la mutación de ácido glutámico adopte una conformación semejante a aquella de L104 por dos razones. En primer lugar, existe espacio insuficiente para acomodar la cadena lateral del ácido glutámico más larga en la estructura sin una perturbación significativa con respecto a la región S25-R33. En segundo

lugar, el costo energético de absorber la carga negativa de la cadena lateral del ácido glutámico en la región hidrofóbica podría ser grande. En lugar de esto, los estudios de modelación predicen que la cadena lateral de ácido glutámico salta hacia fuera sobre la superficie en donde la carga puede ser estabilizada por solvatación. Tal cambio de conformación puede ser acomodado fácilmente por G105, con distorsión mínima a los otros residuos en las regiones.

Aglutinación de Mutantes de Afinidad Elevada hacia las Células de CHO que Expresan CD80 o CD86

El análisis de FACS (Figuras 2A y 2B) de CTLA4Ig y las moléculas mutantes que se aglutinan a las células CD80+ y CD86+CHO transfectadas establemente fue efectuado como se describió aquí. Las células de CHO positivas a CD80 y positivas a CD86 fueron incubadas con concentraciones crecientes de CTLA4Ig, L104EA29YIg, o L104EIg, y luego se lavaron. La proteína de fusión de la inmunoglobulina unida fue detectada utilizando inmunoglobulina anti-humana, de cabra, conjugada con isotiocianato de fluoresceína.

Como se muestra en las figuras 2A y 2B, las células de CHO positivas a CD80 o positivas a CD86 (1.5×10^5) fueron incubadas con las concentraciones indicadas de CTLA4Ig (cuadrados cerrados), L104EA29YIg (círculos), o L104EIg (triángulos) durante 2 horas a 23 °C, se lavan, y se incuban con el anticuerpo de la inmunoglobulina anti-humana, de

cabra, conjugada con isotiocianato de fluoresceína. La aglutinación sobre un total de 5,000 células viables fue analizada (determinación única) sobre un FACScan, y la intensidad de la fluorescencia promedio (MFI) fue determinada de los histogramas de datos utilizando PC-LYSYS. Los datos fueron corregidos para verificar la fluorescencia del fondo medida sobre las células incubadas con el reactivo de la segunda etapa solamente (MFI = 7). El control L6 mAb (80 µg/ml) dio MFI < 30. Estos resultados son representativos de cuatro experimentos independientes.

La aglutinación de L104EA29YIg, L104EIg, y CTLA4Ig a las células de CHO transfectadas con CD80 humano es aproximadamente equivalente (Figura 2A). La L104EA29YIg y L104EIg se aglutinan más fuertemente a las células de CHO transfectadas establemente con CD86 humano que lo que lo hace CTLA4Ig (Figura 2B).

Ensayos funcionales:

Las células positivas de CD4 humanas fueron aisladas por selección negativa inmunogénica (Linsley et al, (1992) J. Exp. Med., 176:1595-1604). Las células T positivas a CD4 aisladas fueron estimuladas con el acetato y miristato de forbal (PMA) más las células de CHO positivas a CD80 o positivas a CD86 en la presencia de concentraciones de titulación del inhibidor. Las células T positivas a CD4 (8-10 x 10^4/cavidad) fueron cultivadas en la presencia de PMA 1 nM

con o sin estimuladores de las células de CHO irradiadas. Las respuestas proliferativas fueron medidas por la adición de 1 µCi/cavidad de [3H]timidina durante las 7 horas finales de un cultivo de 72 horas. La inhibición de PMA más las células T estimuladas, de CHO positivas a CD80, o de CHO positivas a CD86, por L104EA29YIg y CTLA4Ig fue efectuada. Los resultados son mostrados en las figuras 3A y 3B. L104EA29YIg inhibe la proliferación de las células de CHO tratadas con PMA positivas a CD80 más que CTLA4Ig (figura 3A). L104EA29YIg también es más efectivo que CTLA4Ig en la inhibición de la proliferación de las células de CHO tratadas con PMA positivas a CD86 (figura 3B). Por lo tanto, L104EA29YIg es un inhibidor más potente de la co-estimulación mediadas tanto por CD80 como por CD86 de las células T.

Las figuras 4A y 4B muestran la inhibición por L104EA29YIg y CTLA4Ig de las células T humanas aloestimuladas preparadas anteriormente, y además aloestimuladas con una línea celular del linfoblastoide B humano (LCL) llamada PM que expresó CD80 y CD86 (células T a $3.0x10^4$/cavidad y PM a $8.0x10^3$/cavidad). La aloestimulación primaria ocurrió durante 6 días, luego las células fueron sometidas a impulsos de ^3H-timidina durante 7 horas, antes de que la incorporación de la radioetiqueta fuera

determinada.

La aloestimulación secundaria fue efectuada como sigue. Las células T aloestimuladas primarias siete días fueron colectadas sobre el medio de separación de linfocitos (LSM) (ICN, Aurora, OH) y se dejaron en reposo durante 24 horas. Las células T fueron re-estimuladas entonces (secundariamente), en la presencia de cantidades de titulación de CTLA4Ig o L104EA29YIg, agregando PM en la misma relación que anteriormente. La estimulación ocurrió durante 3 días, luego las células fueron sometidas a impulsos con una radioetiqueta y se colectaron como anteriormente. El efecto de L104EA29YIg sobre las células T aloestimuladas primarias es mostrado en la figura 4A. El efecto de L104EA29YIg sobre las células T aloestimuladas secundarias es mostrado en la figura 4B. L104EA29YIg inhibe las respuestas proliferativas de las células T tanto primarias como secundarias mejor que CTLA4Ig.

Para medir la producción de citosina (figuras 5A-5C), se adaptaron placas de aloestimulación secundaria duplicadas. Después de 3 días, el medio de cultivo fue ensayado utilizando los kits de ELISA (Biosource, Camarillo, CA) utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante. L104EA29YIg se encontró que va a ser más potente que CTLA4Ig

en el bloqueo de la producción de las citocinas de IL-2, IL-4, y γ-IFN de las células T después de un estímulo alogenéico secundario (figuras 5A-5C).

Los efectos de L104EA29YIg y CTLA4Ig sobre la respuesta de los linfocitos mezclados del mono (MLR) son mostrados en la figura 6. Las células mononucleares de la sangre periférica (PMBC'S, $3.5x10^4$ células/cavidad de cada mono) de 2 monos, fueron purificadas sobre el medio de separación de linfocitos (LSM) y se mezclaron con 2 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA). Las células fueron estimuladas 3 días luego sometidas a impulsos de la radioetiqueta 16 horas antes de la colección. L104EA29YIg inhibió la proliferación de las células T del mono mejor que CTLA4Ig.

Tabla II: Efecto sobre la aglutinación de CD86Ig por la mutagénesis de CTLA4Ig en los sitios listados

		Efectos de la mutagénesis	
Sitio de la mutagénesis	Sin efecto aparente	Velocidad de "encendido" lenta/velocidad de "apagado" lenta	Aglutinación reducida del ligando
S25		+	
P26	+		
G27	+		
K28	+		
A29		+	
T30		+	
E31			+
R33			+
K93		+	
L96		+	
M97			+
Y98			+
P99			+
P100			+

		Efectos de la mutagénesis	
Sitio de la mutagénesis	Sin efecto aparente	Velocidad de "encendido" lenta/velocidad de "apagado" lenta	Aglutinación reducida del ligando
P101			+
Y102			+
Y103		+	
L104		+	
G105		+	
I106	+		
G107	+		
Q111	+		
Y113	+		
I115	+		

(El efecto predominante está indicado con un signo de "+").

Ejemplo 3

Este estudio comparó la eficacia y seguridad de L104EA29YIg, descrito anteriormente, como un inmunosupresor de mantenimiento con CsA durante 12 meses cuando se utilizó como una parte de un régimen combinado libre de CNI que consiste de la inducción con basiliximab (Simulect®, Novartis), micofenolato de mofetilo (MMF; CellCept®; Roche), y corticosteroides en receptores de trasplantes renales.

Los receptores adultos de un aloinjerto renal no idéntico a HLA de un donador vivo o fallecido fueron elegibles. Los sujetos con un trasplante renal previo, una historia de anticuerpos reactivos con el panel de > 20%, o aquellos considerados por el investigador que van a estar en riesgo más elevado de rechazo agudo fueron restringidos a $\leq$ 10% de la población de estudio. Los criterios de exclusión

incluyeron la enfermedad renal subyacente de la glomeruloesclerosis focal y segmentada. La glomerulonefritis membranoproliferativa del tipo I o del tipo II, o el síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica; hepatitis B o C activa, o VIH; y la edad del donador >60 ó <6, donadores con muerte cardiaca, o tiempo de isquemia por enfriamiento del riñón del donador de > 36 horas.

Este fue un estudio en centros múltiples, de dosis múltiples, controlado-activo, aleatorio, de etiqueta abierta, efectuado en los Estados Unidos de América, Europa y Canadá. Los pacientes elegibles de cualquier sexo con edad $\geq$ 18 años que padecen un trasplante renal (donador vivo o fallecido, excepto cuando el donador y receptor fueron idénticos a HLA), fueron distribuidos aleatoriamente para el tratamiento en una proporción 1:1:1 con un régimen de tratamiento más intenso (MI) de L104EA29YIg, un régimen de tratamiento menos intenso (LI) de L104EA29YIg, o Ciclosporina A (CsA); todos en combinación con terapia de inducción con basiliximab (Simulect®; Novartis), terapia de mantenimiento adjunta con micofenolato de mofetilo (MMF; CellCept®; Roche), y corticosteroides. Ambos regímenes de L104EA29YIg incluyeron una fase inicial, en la cual L104EA29YIg fue administrada a 10 mg/kg y una fase de mantenimiento, en la cual L104EA29YIg fue administrada a 5 mg/kg en intervalos de cada 4 semanas o de cada 8 semanas. Las dosis para cada régimen estuvieron

basadas en el peso corporal. Estas dosis fueron dictadas por los perfiles objetivo reducidos que se mostró que van a ser efectivos durante los estudios de primates no humanos. Estos perfiles necesitaron dosis que fueron más elevadas inicialmente, durante el período de riesgo inmunológico más grande (Días 0-90). La fase inicial fue más prolongada en el régimen de MI (6 contra 3 meses) e incluyó una dosificación más frecuente.

Un régimen de tratamiento más intenso (MI) de L104EA29YIg consistió de la administración de 10 mg/kg en los días 1, 5, 15, 29, 43, 57, 71, 85, 113, 141 y 169, seguido por 5 mg/kg cada 4 u 8 semanas. El régimen de tratamiento menos intenso (LI) de L104EA29YIg consistió de la administración de 10 mg/kg en los días 1, 15, 29, 57, y 85, seguido por 5 mg/kg cada 4 u 8 semanas. El L104EA29YIg se administró en infusión intravenosa 30 minutos. Los pacientes distribuidos aleatoriamente con respecto a CsA recibieron dosis dos veces diariamente (7 $\pm$ 3 mg/kg) para lograr el intervalo pre-especificado de las concentraciones del suero objetivo de 150-400 ng/ml durante el primer mes y 150-300 ng/ml durante los meses 2-12, lo cual es consistente con la práctica médica común. Todos los pacientes recibieron 2 g de MMF diariamente y 20 mg de basiliximab cada 4 días. Un régimen graduado de corticosteroides también fue provisto, el cual consiste de un bolo iv de 500 mg de metilprednisolona el

día 1 y 250 mg el día 2, seguido por 100 mg de prednisona oral el día 3, 50 mg el día 4, 25 mg los días 5-30, 22.5 mg los días 31-44, 20 mg los días 45-58, 17.5 mg los días 59-72, 15 mg los días 73-86, 12.5 mg los días 87-100, y 10 mg los días 101-114. Después del día 114, la dosis de prednisona podría ser reducida en 2.5 mg cada otro mes pero no a menos de 5 mg por día.

El objetivo primario fue demostrar que L104EA29YIg no fue inferior a CsA en la prevención del rechazo agudo a los 6 meses. Los objetivos secundarios incluyeron la evaluación de la incidencia del rechazo agudo (presumida o confirmada por biopsia) a los 6 meses y 1 año; la velocidad de filtración glomerular medida (GFR) por medio de depuración con iohexol a los 1, 6, y 12 meses; los parámetros de hipertensión; colesterol en el suero y triglicéridos; y seguridad total. Otros análisis pre-especificados incluyeron la muerte del paciente o la pérdida del injerto en el año 1; la severidad del rechazo agudo; la incidencia de la diabetes mellitus post-trasplante (definida como cualquier terapia requerida para la hiperglucemia durante $\geq$ 4 semanas, o una A1C de hemoglobina (HbA1c) > 7 %, en pacientes que no se sabía previamente que fueran diabéticos); GFR calculada, utilizando la Modificación de la Dieta en la Enfermedad Renal (MDRD, Levey AS, Bosch JP, Lewis JP, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate

from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. Ann Intern Med 1999: 130:461-470), Jelliffe (RW. Creatinine clearance: Bedside estimate. Ann Inter Med. 1973; 79:604-605), Cockcroft-Gault (Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. Nephron 1976; 16:31-41), y Nankivell (Nankivell BJ, Gruenewald SM, Allen RD, Chapman JR. Predicting glomerular filtration rate after kidney transplantation. Transplantation 1995;59(12):1683-1689) formulas; pharmacokinetics and immunogenicity. El diagnóstico y el tratamiento del rechazo agudo (AR) estuvieron basados en los grados y criterios de Banff 97 (Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int 1999;55(2):713-23). Un análisis post-hoc fue llevado a cabo sobre la incidencia de la nefropatía crónica del aloinjerto (CAN).

El diagnóstico y tratamiento del rechazo agudo (AR) estuvo basado en los criterios y grados de Banff 97 (Racusen LC, Solez K, Colvin RB, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. Kidney Int 1999;55(2):713-23). Las biopsias del aloinjerto renal intraoperativo fueron efectuadas para evaluar la histología de la línea base. El tejido al cual se le hizo la biopsia fue teñido y graduado de acuerdo con la clasificación de trabajo

de Banff 97 de la patología del trasplante del riñón. Las biopsias fueron evaluadas por un patólogo independiente a quien se le ocultó el tratamiento para confirmar todos los episodios del AR sospechosos clínicamente previo al tratamiento para AR.

Los puntos finales adicionales incluyeron: CSBPAR a los 12 meses; muerte o pérdida de injerto en el año 1; la severidad de los episodios de AR (medida utilizando la escala de Banff), la falla del tratamiento (definida como la opinión del investigador; $\geq$ del grado IIB de rechazo; rechazo recurrente o resistente a los esteroides); función renal a los 1, 6 y 12 meses (velocidades de filtración glomerular [GFRs] evaluada por la depuración de Iohexol) y evidencia de la nefropatía crónica del aloinjerto (CAN) (fibrosis intersticial y atrofia tubular); los parámetros de hipertensión (presión sanguínea diastólica [BP] $\geq$ 90 mm Hg y/o BP sistólica $\geq$ 140 mm Hg); lípidos en el suero; seguridad, tolerabilidad y eventos adversos (AEs) en pacientes tratados con L104EA29YIg comparado con los pacientes tratados con CsA.

Para las evaluaciones de seguridad y tolerabilidad, los AEs, las mediciones de laboratorio (análisis de hematología, bioquímica y orina) y los signos vitales fueron registrados durante las visitas clínicas programadas regulares.

Resultados

Un total de 218 pacientes padecieron el trasplante renal y fueron distribuidos aleatoriamente con respecto al grupo MI (N=74), el grupo LI (N=71), o CsA (N=73). Las características demográficas y clínicas de la línea base fueron semejantes entre los tres grupos de tratamiento. Un total de 164 pacientes complementaron 1 año de tratamiento. De los pacientes que suspendieron el tratamiento previo a 1 año (N=16 contra 16 contra 20; régimen de MI contra régimen de LI contra CsA), las razones más comunes fueron AEs (N=5 contra 8 contra 9) y falla del tratamiento (N=7 contra 5 contra 3).

La incidencia de CSBPAR ocurrió no frecuentemente en todos los grupos de tratamiento, y no existió diferencia estadísticamente significativa en la incidencia de ya sea CSBPAR o BPAR entre los grupos de tratamiento. A los 6 y 12 meses, la incidencia de CSBPAR fue de 6.8 %, 5.6 % y 8.2 % para el tratamiento de MI, LI y CsA, respectivamente.

La incidencia de BPAR también fue semejante entre los grupos a los 6 y 12 meses, aunque BPAR fue ligeramente más elevada en el grupo LI que en los otros dos grupos (18.9 %, 29.6 % y 17.8 % para el tratamiento de MI, LI y CsA respectivamente). El rechazo agudo provisto por biopsia fue más frecuente que CSBPAR en todos los grupos de tratamiento, y fue aún más común en el grupo LI. Sin embargo, muchos de estos eventos fueron se encontró que ocurren en pacientes con

L104EA29YIg abajo de las concentraciones reducidas en el suero deseadas.

Ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de tratamiento fue observada en la severidad de AR; sin embargo los números fueron pequeños y no condujeron como resultado a la pérdida del injerto.

Este estudio no fue protegido con respecto al medicamento de estudio para permitir un estándar de cuidado con respecto a CsA, lo cual contribuyó probablemente al número incrementado de biopsias tomado en los grupos L104EA29YIg (N=345) comparado con el grupo CsA (N=144). Aunque esto no es inesperado para un estudio diseñado de esta manera, podría haber incrementado la velocidad de diagnóstico de las anormalidades histológicas renales en los grupos de tratamiento de L104EA29YIg.

La muerte y/o la pérdida del injerto no fue frecuente en todos los grupos de tratamiento, con 1 muerte reportada en el grupo MI, 4 en el grupo de CsA y ninguna en el grupo L1. La mayoría de pérdidas de injerto no fueron provocadas por los eventos inmunológicos y solamente 3 injertos fueron perdidos en los grupos de MI y CsA contra 1 en el grupo LI.

Se observaron mejoras significativas en la función renal con el tratamiento a base de L104EA29YIg comparado con la inmunosupresión a base de CsA. La depuración con Iohexol fue mayor con el tratamiento con L104EA29YIg en todos los

instantes del tiempo, con una mejora promedio de 11 ml/minuto/1.73 m^2 (~20%) comparado con CsA a los 12 meses.

A los 12 meses, la nefropatía crónica de aloinjerto (CAN) fue de entre 30 y 50 % menos común, en términos relativos, en L104EA29YIg - que los pacientes tratados con CsA. Las velocidades de una nueva CAN o del empeoramiento de CAN a los 12 meses fueron del 29 %, 19 % y 44 % para los grupos de MI, LI y CsA, respectivamente.

En el año 1, la presión sanguínea sistólica promedio fue de 3-4 mm Hg más elevada en los pacientes tratados con CsA (133 mm Hg contra los pacientes en los grupos de tratamiento de MI (130 mm Hg) y LI (129 mm Hg). Esto fue a pesar del uso inferior del medicamento anti-hipertensivo en los grupos de L104EA29YIg (MI: 87.5 %; LI: 84.1%; CsA 92.2 %). El colesterol total en el suero fue ligeramente inferior con L104EA29YIg (MI: 198 mg/dl; LI: 201 mg/dl) contra los pacientes tratados con CsA (121 mg/dl) aunque con el uso de un medicamento reductor de los lípidos también fue inferior con L104EA29YIg (MI: 36.1 %; LI: 31.9%; CsA: 53.1 %).

Cuatro pacientes (5.5 %) murieron en el grupo de CsA comparado con 1 en el grupo de tratamiento con L104EA29YIg. Las velocidades de los eventos adversos (AEs) fueron comparables entre los grupos de tratamiento; sin embargo, las AEs relacionadas fueron significativamente inferiores después

del tratamiento con L104EA29YIg que con el tratamiento con CsA. La administración intravenosa de L104EA29YIg fue bien tolerada sin reacciones de infusión. Los pacientes tratados con L104EA29YIg no exhibieron eventos adversos relacionados con CsA típicos, tales como anemia, leucopenia, hirsutismo, temblores e hiperplasia gingival. La terapia a base de L104EA29YIg no estuvo asociada con ningún riesgo incrementado de infecciones o malignidades comparado con la terapia a base de CsA.

Conclusión

Este estudio de 12 meses demuestra que la terapia de mantenimiento a base de L104EA29YIg confiere eficacia equivalente en la prevención de AR y una supervivencia del paciente y del injerto semejantes comparado con CsA. Además, L104EA29YIg demostró mejoras significativas en la función renal y reducciones en CAN comparado con la inmunosupresión de mantenimiento a base de CsA. L104EA29YIg fue más seguro y bien tolerado y no estuvo asociado con las toxicidades relacionadas con CNI típicas.

Las velocidades de CSBPAR y BPAR fueron semejantes entre los tres grupos de tratamiento demostrando que las velocidades bajas de AR observadas con la terapia a base de CsA también son logradas con L104EA29YIg. La mayoría de BPARs fueron clasificados como sub-clínicos, sugiriendo que la función renal no fue alterada. La velocidad numéricamente

inferior de AR en el grupo MI, comparado con el grupo LI, sugiere una posible respuesta dependiente de la dosis con L104EA29YIg. Las biopsias más frecuentes en los grupos de L104EA29YIg podrían haber conducido potencialmente al sobre-diagnóstico del rechazo tanto agudo como crónico en estos grupos, sugiriendo que los beneficios de la terapia de L104EA29YIg pueden ser subestimados en este estudio.

La mayoría de eventos de BPAR ocurrió dentro de los primeros tres meses post-trasplante, lo cual no es inesperado puesto que otros han mostrado que se requieren dosis más elevadas de inmunosupresores durante el período de pos-trasplante inicial (Wiecek A, Nowicki M, Kokot F, Ritz E. Acute failure of the transplanted kidney-pathophysiology, diagnosis and prevention. Ann Transplant 1996;1(4):5-9 y Bennett WM. Posttransplant acute renal failure. Ren Fail 1997;19(2):225-6). Puesto que la mayoría de estos eventos ocurrieron abajo de los valores reducidos deseados, se debe considerar la alteración del régimen en el primer mes de tratamiento, previo a alcanzar un estado permanente. La mayoría de BPARs observados durante la fase de mantenimiento ocurrieron a niveles muy bajos o indetectables de L104EA29YIg, sugiriendo que la incidencia de AR durante estos períodos estuvo relacionada con una inmunosupresión insuficiente, lo cual puede ser evitado por alteraciones en el régimen de dosificación.

Este estudio demuestra que L104EA29YIg está asociado con velocidades de AE totales semejantes comparado con CsA, con un número menor de AEs relacionados con el fármaco de estudio. Ninguna diferencia real en el número de AEs relacionados con una causa viral fueron identificados entre los tres grupos de tratamiento.

En la presencia de velocidades bajas de AR, la nueva meta de la inmunosupresión del mantenimiento es la reducción en las complicaciones de la salud a largo plazo, incluyendo la hipertensión, hiperlipidemia, toxicidad del fármaco, y la prevención de la formación de cicatrices. Como en las enfermedades autoinmunes, una nueva generación de agentes inmunosupresores de mantenimiento inmunoselectivo está surgiendo. La inhibición de la co-estimulación de las células T por medio del bloqueo de co-estimulación inmunoselectiva con L104EA29YIg representa un nuevo paradigma, ofreciendo la promesa de una inmunosupresión de mantenimiento más selectiva, toxicidades reducidas y resultados mejorados a largo plazo en el trasplante renal.

Ejemplo 4

Existe una necesidad médica substancial no satisfecha de nuevas terapias en el trasplante renal que puedan proporcionar una supervivencia del injerto y del sujeto a corto plazo comparable con el CNIs sin sus efectos nefrotóxicos, cardiovasculares, y metabólicos a largo plazo.

La necesidad es particularmente grande entre los receptores de aloinjertos renales con ECD definida, cuyas tasas de supervivencia del injerto y el sujeto a largo plazo son distintivamente inferiores que aquellas de los receptores de los aloinjertos de los donadores que satisfacen los criterios de elegibilidad estándares. L104EA29YIg, un agente inmunosupresor con un mecanismo de acción novedoso, es un candidato no nefrotóxico prometedor para su uso en receptores de trasplante renal de los aloinjertos de ECD. A causa de que L104EA29Yig puede ser administrado en el tiempo del aloinjerto en lugar de un modo retardado, como es frecuentemente necesario con los CNIs, - especialmente en aquellos aloinjertos con función renal inicial alterada - produce la inmunosupresión de una manera sincronzada y sin la necesidad de preparaciones de antilinfocitos policlonales. Esto puede traducirse en tasas comparables de rechazo agudo con un perfil de seguridad favorable. Como L104EA29YIg no se anticipa que va a ser nefrotóxico, se deben observar los beneficios adicionales con respecto a la estructura del aloinjerto (es decir, CAN) y la función (es decir, GFR). Finalmente, a diferencia de los CNIs, el mecanismo objetivo de acción de L104EA29YIg debe proporcionar inmunosupresión sin afectar adversamente el perfil cardiovascular/metabólico. Una evaluación del beneficio-riesgo total para el uso de L104EA29YIg en esta población de sujetos es provista

posteriormente.

Dos regímenes de la dosis (como se describieron en el ejemplo 3, con una modificación menor al régimen de LI y utilizando el programa de instrucción de mantenimiento cada 4 semanas) serán estudiados.

Objetivos primarios

1) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre el compuesto de la supervivencia del sujeto y del aloinjerto a los 12 meses.

2) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre el compuesto de GFR medido < 60 ml/minuto/1.73 m^2 en el mes 12 o una reducción en el GFR medido >10 ml/minuto/1.73 m^2 desde el mes 3 hasta el mes 12.

Objetivos secundarios

1) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre el GFR medido a los 12 meses.

2) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre el CAN probado por biopsia hasta 12 meses.

3) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre el GFR medido a los 3 meses, y cambiar desde la línea base (3 meses) hasta 12 meses.

4) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre la proporción de sujetos con un GFR medido < 30 ml/minuto/1.73 m^2 a los 12 meses.

5) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a

CsA, sobre el GFR calculado a los 3, 12, 24 y 36 meses, y cambiar de la línea base (3 meses) hasta 12, 24, y 36 meses.

6) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre PTDM a los 12, 24, y 36 meses.

7) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre las medidas de hipertensión a los 12, 24, y 36 meses, incluyendo SBP y DBP, la incidencia y prevalecencia de la hipertensión y de la hipertensión controlada, y la intensidad del régimen de tratamiento.

8) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre las mediciones de la dislipidemia, a los 12, 24, y 36 meses, incluyendo las lipoproteínas de densidad baja (LDL), diferentes de HDL, en el suero total, y el colesterol de HDL y la incidencia de TGs y la prevalecencia de dislipidemia y dislipidemia controlada, y la intensidad del régimen de tratamiento.

9) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la supervivencia del injerto y sujeto a los 24 y 36 meses.

10) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre las medidas del rechazo agudo a los 6 meses, incluyendo la incidencia y la severidad del rechazo agudo, el uso de preparaciones de antilinfocitos policlonales para función renal alterada y DGF anticipado, el uso inicial de la terapia de agotamiento de linfocitos para el tratamiento de

rechazo agudo, la incidencia del rechazo agudo resistente a los esteroides, la incidencia de recuperación completa (SCr regresando a la línea base) después del rechazo agudo, la incidencia del rechazo subclínico, y la incidencia de todos los episodios de rechazo agudo tratado sin importar los descubrimientos histológicos.

11) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre QoL.

12) Evaluar la seguridad total de L104EA29YIg con relación a CsA.

Objetivos terciarios

1) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la pendiente y la intersección del GFR calculado desde la línea base (3 meses) hasta 12, 24, y 36 meses.

2) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la proporción de sujetos con un GFR medido < 45 ml/minuto/1.73 m^2 a los 12 meses.

3) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la proporción de los sujetos con < 75 ml/minuto/1.73 m^2 del GFR calculado en el mes 12 y los sujetos con una reducción en el GFR calculado desde el mes 3 hasta el mes 12 de al menos 15 ml/minuto/1.73 m^2.

4) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la incidencia de DGF.

5) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a

CsA, sobre las mediciones del rechazo agudo, a los 12, 24 y 36 meses, incluyendo la incidencia y severidad de rechazo agudo, el uso de preparaciones antilinfocíticas policlonales para la función renal alterada y DGF anticipado, el uso inicial de la terapia de agotamiento de los linfocitos para el tratamiento del rechazo agudo, y la incidencia del rechazo agudo con resistencia a los esteroides, la incidencia de la recuperación total (SCr regresando a la línea base) después del rechazo agudo, la incidencia del rechazo subclínico, y la incidencia de todos los episodios de rechazo agudo sin importar los descubrimientos histológicos.

6) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre un punto final de la enfermedad cardiovascular compuesta (muerte cardiovascular adjudicada, infarto de miocardio, ataques isquémicos, hospitalización no seleccionada por causa cardiovascular, e intervención coronaria percutánea) a los 12, 24, y 36 meses.

7) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre el punto final de la enfermedad cardiorenal compuesta (muerte, pérdida del injerto, infarto de miocardio no fatal, y ataque) a los 12, 24 y 36 meses.

8) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre el valor de riesgo de Framingham a los 12, 24 y 36 meses.

9) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a

CsA, sobre la incidencia de la detención del fármaco de estudio.

10) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre los anticuerpos del antígeno del leucocito humano (HLA) anti-donador.

11) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la positividad de C4d en los especímenes de la biopsia.

Diseño de estudio

La duración de estudio es de 3 años con un período de seguimiento de 8 semanas subsiguientes para evaluaciones de seguridad. Al final del período de tratamiento de 3 años, los sujetos pueden ser elegibles para un estudio de extensión a largo plazo.

Este es un estudio de grupo paralelo, controlado de manera activa, parcialmente protegido, aleatorio. Todos los sujetos recibirán un riñón de un donador con criterios extendidos como se definió posteriormente. Estos criterios están basados en parte en aquellos expedidos por la United Network of Organ Sharing (UNOS); los mismo también incluyen otras características utilizadas ampliamente para identificar órganos potencialmente comprometidos, tales como aquellos de donadores con muerte cardiaca (DCD sin latido cardiaco) o con tiempo de isquemia por frío prolongado (CIT).

Aproximadamente 540 sujetos se han distribuido

aleatoriamente en una proporción 1:1:1 para el tratamiento con ya sea L104EA29YIg (régimen MI), L104EA29YIg (régimen LI), o CsA. Todos los sujetos también recibirán la inducción con basiliximab y un régimen inmunosupresivo de mantenimiento de MMF y costicosteroides. Los sujetos distribuidos aleatoriamente en cuanto al régimen de MI recibirán L104EA29YIg i.v. (10 mg/kg) los días 1 y 5, luego cada 2 semanas hasta el mes 3 (semanas 2, 4, 6, 8, 10, y 12), y luego cada 4 semanas hasta 6 meses (semanas 16, 20, y 24). Después de 6 meses, los sujetos en el grupo de tratamiento de MI recibirán la dosis de mantenimiento de L104EA29YIg 5 mg/kg administrada cada 4 semanas hasta el complemento de ensayo a los 36 meses. Los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto al régimen LI recibirán L104EA29YIg i.v. (10 mg/kg) en los días 1 y 5, y luego cada 2 semanas hasta el mes 1 (semanas 2 y 4), y cada 4 semanas hasta el mes 3 (semanas 8 y 12). Después de 3 meses, los sujetos en el grupo de tratamiento de LI recibirán la dosis de mantenimiento de 5 mg/kg de L104EA29YIg administrada cada 4 semanas hasta el complemento del ensayo a los 36 meses.

La protección u ocultamiento entre los grupos de LI y MI será preservado con el uso de infusiones de placebo en el grupo de tratamiento de LI en las semanas 6 y 10. Los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto a CsA recibirán dos dosis diariamente que están diseñadas para lograr un

intervalo de concentración del suero hasta el especificado, consistente con la práctica médica común.

El uso de preparaciones de antilinfocitos policlonales (timoglobulina o ATGAM) es permitida - pero no requerida - para los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto a CsA que experimentan una función alterada del aloinjerto renal y DGF anticipado. Estos agentes son utilizados ampliamente en esta capacidad para dar la inmunosupresión hasta que se recupera la función del injerto para la administración de CsA. La decisión de utilizar y dosificar una preparación de antilinfocitos policlonales en este medio clínico es a criterio del investigador dentro de las reglas del protocolo. La seguridad y eficacia de L104EA29YIg será evaluada a los 1, 2, y 3 años.

Medidas de los resultados primarios

Cada régimen a base de L104EA29YIg será comparado con el régimen a base de CsA sobre las siguientes medidas de resultados de eficacia primarios: (1) el compuesto de la supervivencia del sujeto y el injerto a los 12 meses; (2) el material compuesto de GFR medido < 60 ml/minuto/1.73 m^2 en el mes 12 o una reducción en la GFR medido $\geq$ 10 ml/minuto/1.73 m^2 desde el mes 3 hasta el mes 12. El intento es demostrar que no existe inferioridad para la pérdida del injerto y para la muerte y superioridad para la función renal. El punto final de la supervivencia del injerto y el sujeto fue

seleccionado puesto que estas medidas son los resultados clínicos más importantes para los receptores del aloinjerto. Aunque la pérdida del aloinjerto puede ser prevenida por terapia inmunosupresiva efectiva, la misma terapia puede incrementar el riesgo de muerte debido a infección, PTLD, malignidades, nefrotoxicidad, o enfermedad cardiovascular. Por consiguiente, es apropiado examinar el punto final de la supervivencia del sujeto y el injerto como una medida resumida del beneficio neto de la terapia inmunosupresora en los receptores del aloinjerto. Este punto final del compuesto tiene la ventaja adicional de que se puede evaluar en todos los sujetos sin cambio debido a datos erróneos o clasificación errónea del sujeto.

La función renal como un punto final fue seleccionada puesto que la relación entre el resultado renal a largo plazo y la función renal post-trasplante ha sido demostrada repetidamente en varios medios. La asociación está presente ya sea si la función renal es medida a los pocos días después del trasplante, en el tiempo de la descarga desde el hospital, o a los 6 y 12 meses siguientes al trasplante. Se ha observado en los receptores de riñones de donadores vivos y cadáveres, en los receptores de riñones de donadores de cadáveres más jóvenes y más ancianos, en receptores de segundo trasplante, y en receptores adultos y pediátricos.

Los resultados de los estudios de centros múltiples

confirman la importancia de SCr para predecir la supervivencia del injerto a largo plazo. La relación entre la función renal y el pronóstico a largo plazo es fuerte y reproducible, pero no estrictamente lineal. En un análisis de los receptores del trasplante renal adultos, la examinación de la relación entre SCr en el año 1 y la vida media proyectada del injerto promedio, revelaron un punto de inflexión pronunciado en SCr > 1.5 mg/dl. De manera semejante, el examen de la relación entre el cambio en SCr desde los 6 meses hasta 1 año (Δ SCr) y la vida media proyectada del injerto promedio revelaron un punto de inflexión pronunciado en Δ SCr $\geq$ 0.3 mg/dl. Así, tanto el nivel absoluto de la función renal en el año 1 como el cambio en la función renal desde los 6 meses (o un punto del tiempo post-trasplante inicial, estable, semejante) hasta 1 año, es adecuado para su uso como una medida del resultado. La presencia de la no-linearidad en la relación de la función renal contra el resultado a largo plazo, sugiere que las medidas categóricas de la función renal podrían ser de relevancia clínica mayor que las dimensionales. Los valores de umbral > 1.5 mg/dL a un año para la función renal y el cambio en SCr de $\geq$ 0.3 mg/dL desde el mes 6 hasta el año 1, parecieron apropiados.

En los estudios referidos anteriormente, la importancia del pronóstico de la función renal fue demostrada utilizando

SCr como un marcador. Estos estudios fueron en general demasiado grandes para utilizar medidas directas de la filtración glomerular. Las limitaciones de SCr como un marcador de la función renal son bien conocidas. Los niveles de SCr reflejan principalmente el equilibrio entre la excreción renal de la creatinina y la generación endógena de la creatinina. Esto último puede ser afectado significativamente por las variaciones en la masa muscular, infección, inflamación, y uso de esteroides, los cuales son todos comunes en la población de trasplante. Sin embargo, la excreción renal de creatinina puede ocurrir por 2 rutas - filtración glomerular y secreción tubular. El impacto de la pérdida de la filtración glomerular sobre el SCr está enmascarado comúnmente por los incrementos compensatorios en la secreción tubular, y la utilidad del SCr incrementado como un marcador de la alteración renal es reducida por esto. Se ha estimado que 40 % de los sujetos con GFR reducido tendrán un SCr normal o bajo. Se han desarrollado numerosas fórmulas que buscan mejorar la correlación entre SCr y GFR por el conteo del efecto de los factores demográficos y biométricos. El nivel de acuerdo entre el GFR estimado de varias fórmulas y el GFR verdadero medido por la depuración de insulina, fue estudiado en 294 receptores del trasplante con función renal estable. La proporción de los valores de GFR predichos fueron diferentes de la depuración de insulina medida por al menos

10 ml/minuto/1.73 m^2 que varió desde 34 % para la fórmula de Jelliffe hasta 53 % para la fórmula de Nankivell. La fórmula propuesta por Levey et al será utilizada para calcular el GFR en este estudio. Esta fórmula se ha mostrado que predice el GFR más exactamente en la población del trasplante, teniendo la mejor correlación entre el valor predicho y el valor medido que otras fórmulas, tales como Nankivell. Dada la diferencia substancial entre el GFR y el GFR calculado, la depuración de un marcador de filtración glomerular verdadero será utilizada para evaluar el punto final primario de la función renal (apéndice 1). Un GFR de 60 ml/minuto/1.73 m^2, o el cambio en GFR de al menos 10 ml/minuto/1.73 m^2 será utilizado como cantidades iguales aproximadas de los valores de umbral de SCr de 1.5 mg/dL o el cambio en SCr de al menos 0.3 mg/dL, establecido en estudios epidemiológicos grandes. El cambio del componente del punto final del compuesto será evaluado desde los meses 3 a 12, puesto que la función renal post-trasplante es ampliamente estable por el mes 3.

Otras Medidas de resultados

Los objetivos secundarios clave son evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre el GFR medido a los 12 meses y sobre CAN probado por biopsia a los 12 meses. Estos puntos finales son segregados desde otros puntos finales secundarios para enfatizar su importancia en la evaluación de L104EA29YIg. Como se describió anteriormente,

la masa del nefrón funcional y la reserva renal en los riñones de ECD son probablea a ser reducidas en el tiempo del trasplante debido a las características del donador (por ejemplo, edad avanzada, co-morbididades cardiovasculares, procedimientos de procuración, y CIT), con tasas de supervivencia del injerto y del sujeto resultantes que están muy abajo de aquellas observadas con los criterios estándares para la donación de órganos. Puesto que la función renal es reducida potencialmente con el transcurso del tiempo del injerto, es posible que una proporción substancial de sujetos puedan satisfacer los criterios para el punto final de la función renal co-primaria en el tiempo de la entrada del estudio o la determinación de la función del aloinjerto renal de la línea base. En consecuencia, un objetivo secundario clave del protocolo es evaluar los efectos de L104EA29YIg con relación a CsA, en la diferencia en el GFR medido a los 12 meses. Este punto final secundario clave permite el discernimiento de los efectos de L104EA29YIg, cuando se compara con CsA, sin importar la variabilidad del donador preexistente en esta población de ECD. La misma también contribuye a la evaluación de la función renal en total, y refuerza adicionalmente la conclusión de que L104EA29YIg proporciona un beneficio médico significativo en los receptores del trasplante renal. El objetivo secundario clave restante es el CAN probado por biopsia a los 12 meses. CAN es

el segundo motivo solamente para una muerte con un injerto funcionando como la causa directa de la pérdida del aloinjerto renal, final. Paradójicamente, CNIs se piensa que contribuye a CAN por medio de rutas directas (es decir, efectos nefrotóxicos directos) e indirectas (es decir, efectos cardiovasculares y metabólicos adversos). Debido a su mecanismo específico de acción, L104EA29YIg es improbable a ser, ya sea directamente nefrotóxico o que altere adversamente los parámetros cardiovasculares y metabólicos.

En el ejemplo anterior, los efectos favorables fueron observados en la incidencia reducida de CAN entre los sujetos tratados con L104EA29YIg. En el estudio actual, el establecimiento de una reducción en la incidencia de CAN, en conjunción con una mejora en la función renal, podría reforzar la conclusión de que L104EA29YIg proporciona un beneficio médico significativo en los receptores de trasplante renal. La eficacia de L104EA29YIg en la prevención del rechazo agudo será evaluada por una variedad de medidas de los resultados. Estas incluyen su incidencia, severidad, capacidad de respuesta a la terapia, y los resultados. La interpretación de estas medidas, sin embargo, es complicada por las diferencias intrínsecas en L104EA29YIg y CsA. L104EA29YIg es administrado en el tiempo del trasplante, mientras que CsA es iniciado una vez que existe evidencia de función renal excipiente. Se anticipó que algunos sujetos

distribuidos aleatoriamente con respecto a CsA en este estudio, recibirán una preparación antilinfocítica policlonal para proporcionar la cobertura inmunosupresora si una función renal inicial es alterada y el DGF es anticipado. Esta acción terapéutica puede prevenir o enmascarar el desarrollo del rechazo agudo en sujetos tratados con CsA y hace a los sujetos no evaluables para las medidas de los resultados del rechazo agudo. A causa de que es innecesario tomar una medida semejante en los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto a L104EA29YIg - que son probados desde el tiempo del trasplante- la evaluación comparativa del rechazo agudo no es igual. Para una evaluación más exacta, la eficacia de L104EA29YIg en la prevención del rechazo agudo, el uso de las preparaciones de linfocitos policlonales en esta capacidad también serán reportadas en conjunción con otras medidas del rechazo agudo.

Población de estudio

La población de estudio incluye receptores de aloinjertos renales que son potencialmente sub-óptimos debido a las características del donador, el procedimiento de procuración, CIT, u otros factores. Los criterios de elegibilidad específicos están basados en los "criterios expandidos" para la donación de órganos expedida por UNOS. Los receptores de los riñones de donadores con CIT prolongado o de DCDs, también serán elegibles. En general, los criterios

inmunológicos no desempeñarán un papel principal en la selección del sujeto. Los sujetos a los niveles variables de riesgo inmunológico son elegibles. Sin embargo, el estudio excluirá a los sujetos en un riego inmunológico más grave (anticuerpos reactivos al panel, de correspondencia cruzada positiva [PRA] de $\geq$ 30 %, o aquellos trasplantados previamente). Estos sujetos pueden requerir terapia para reducir su carga de anticuerpos, tales como plasmaféresis, la cual está más allá del alcance de este protocolo. Los sujetos serán enrolados aproximadamente en 90 sitios globalmente.

Mediciones de Resultados de Eficacia Primarios:

1) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre el elemento compuesto de la supervivencia del injerto y del sujeto a los 12 meses, 2) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre el compuesto de GFR medido < 60 ml/minuto/1.73 m^2 en el mes 12 o una reducción en el GFR medido >10 ml/minuto/1.73 m^2 desde el mes 3 hasta el mes 12.

Objetivos secundarios

1) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre el GFR medido a los 12 meses.

2) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre el CAN probado por biopsia hasta 12 meses.

3) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre el GFR medido a los 3 meses, y cambiar desde la

línea base (3 meses) hasta 12 meses.

4) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre la proporción de sujetos con un GFR medido < 30 ml/minuto/1.73 m^2 a los 12 meses.

5) Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre el GFR calculado a los 3, 12, 24 y 36 meses, y cambiar de la línea base (3 meses) hasta 12, 24, y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29Yig, con relación a CsA, sobre PTDM calculado a los 12, 24 y 36 meses.

6) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre las medidas de hipertensión a los 12, 24, y 36 meses, incluyendo SBP y DBP, la incidencia y prevalecencia de la hipertensión y de la hipertensión controlada, y la intensidad del régimen de tratamiento.

7) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre las mediciones de la dislipidemia, a los 12, 24, y 36 meses, incluyend LDL, diferentes de HDL, en el suero total, y el colesterol de HDL y la incidencia de TGs y la prevalecencia de dislipidemia y dislipidemia controlada, y la intensidad del régimen de tratamiento.

8) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la supervivencia del injerto y sujeto a los 24 y 36 meses.

9) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre las medidas del rechazo agudo a los 6 meses,

incluyendo la incidencia y la severidad del rechazo agudo, el uso de preparaciones de antilinfocitos policlonales para función renal alterada y DGF anticipado, el uso inicial de la terapia de agotamiento de linfocitos para el tratamiento de rechazo agudo, la incidencia del rechazo agudo resistente a los esteroides, la incidencia de recuperación completa (SCr regresando a la línea base) después del rechazo agudo, la incidencia del rechazo subclínico, y la incidencia de todos los episodios de rechazo agudo tratados sin importar los descubrimientos histológicos.

1o) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre QoL.

11) Evaluar la seguridad total de L104EA29YIg con relación a CsA.

Mediciones de Resultados Terciarios:

1) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la pendiente y la intersección del GFR calculado desde la línea base (3 meses) hasta 12, 24, y 36 meses.

2) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la proporción de sujetos con un GFR medido < 45 ml/minuto/1.73 m^2 a los 12 meses.

3) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la proporción de los sujetos con < 75 ml/minuto/1.73 m^2 del GFR calculado en el mes 12 y los sujetos con una reducción en el GFR calculado desde el mes 3

hasta el mes 12 de al menos 15 ml/minuto/1.73 m^2.

4) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la incidencia de DGF.

5) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre las mediciones del rechazo agudo, a los 12, 24 y 36 meses, incluyendo la incidencia y severidad de rechazo agudo, el uso de preparaciones antilinfocíticas policlonales para la función renal alterada y DGF anticipado, el uso inicial de la terapia de agotamiento de los linfocitos para el tratamiento del rechazo agudo, y la incidencia del rechazo agudo con resistencia a los esteroides, la incidencia de la recuperación total (SCr regresando a la línea base) después del rechazo agudo, la incidencia del rechazo subclínico, y la incidencia de todos los episodios de rechazo agudo sin importar los descubrimientos histológicos.

6) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre un punto final de la enfermedad cardiovascular compuesta (muerte cardiovascular adjudicada, infarto de miocardio, ataques isquémicos, hospitalización no seleccionada por causa cardiovascular, e intervención coronaria percutánea) a los 12, 24, y 36 meses.

7) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre el punto final de la enfermedad cardiorenal compuesta (muerte, pérdida del injerto, infarto de miocardio no fatal, y ataques) a los 12, 24 y 36 meses.

8) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre el valor de riesgo de Framingham a los 12, 24 y 36 meses.

9) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la incidencia de la detención del fármaco de estudio.

10) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre los anticuerpos del antígeno del leucocito humano (HLA) anti-donador.

11) Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la positividad de C4d en los especímenes de la biopsia.

Definición de Pérdida de Injerto. La pérdida de injerto está definida como ya sea la pérdida funcional o la pérdida física. La pérdida funcional será definida como un nivel sostenido de SCr $\geq$ 6.0 mg/dl (530 µmol/l) como se determina por el laboratorio central durante $\geq$ 4 semanas o $\geq$ 56 días consecutivos de la diálisis, o la alteración de la función renal a tal grado que el sujeto recibió un segundo trasplante. Todas las causas de pérdida de injerto serán adjudicadas por un EAC independiente.

Definición de la Función del Injerto Retardada (DGF). La DGF está definida como un tratamiento con diálisis por el día de estudio 8 (día post-operativo 7).

La definición de la CAN probada por biopsia de la

Nefropatía de Aloinjerto Crónica (CAN por sus siglas en inglés) será determinada por un histopatólogo central en estudios protegidos utilizando la clasificación de trabajo Banff97 de la patología del trasplante del riñón. La incidencia de CAN será determinada comparando todas las biopsias posteriores al día 1 con las biopsias de la línea base obtenidas en el tiempo del trasplante. Esta comparación establece la presencia y severidad de cualquier histopatología pre-existente que pueda ser interpretada posteriormente como CAN.

La definición de la Diabetes Mellitus Post-trasplante PTDM (por sus siglas en inglés) será definida de acuerdo con la definición descrita por una regla de consenso internacional como a) Síntomas de diabetes más una concentración de glucosa en el plasma casual (PG) $\geq$ 200 mg/dl (11.0 mmol/l) O b) glucosa en el plasma en ayuno (FPG) $\geq$ 126 mg/dl (7.0 mmol/l) O c) 2 horas de PG $\geq$ 200 mg/dl (11.0 mmol/l) durante la prueba de tolerancia a la glucosa oral Y d) una prueba de laboratorio confirmatoria basada en las mediciones de la PG venosa se debe hacer en otro día en la ausencia de hiperglucemia inequívoca acompañada por descompensación metabólica aguda. El estudio utilizará FPG para la evaluación de PTDM, sin embargo, si los sujetos son evaluados utilizando estos otros métodos y se encuentra que satisfacen los criterios anteriores, se considerará que

tienen PTDM.

La definición de las Medidas de Hipertensión. La hipertensión será como se definió en este estudio de acuerdo con el Séptimo Reporte del Joint National Detection, Evaluation, and Treatment of high Blood Pressure 21 for subjects with chronic kidney disease. Esta definición está basada en SBP $\geq$ 150 mm Hg o DDP $\geq$ 80 mm Hg. Además, todos los sujetos que tienen una SBP < 130 mm Hg y una DBP < 80 mm Hg quienes están recibiendo una medicación antihipertensiva para la indicación de hipertensión o con una historia médica de hipertensión, están incluidos en esta definición. La incidencia de la hipertensión está definida como la proporción de sujetos que desarrollan la hipertensión después de la distribución aleatoriamente y el trasplante. La prevalecencia de la hipertensión está definida como la proporción de sujetos en cualquier instante dado que satisfacen la definición establecida de hipertensión. La hipertensión controlada está definida como una SBP < 130 mm Hg y una DBP < 80 mm Hg mientras que se recibe una medicación antihipertensiva para la indicación de hipertensión o que está recibiendo una medicación antihipertensiva para otra indicación con una historia médica de hipertensión. Los sujetos con SBP < 130 mm Hg y una DBP < 80 mm Hg a quienes se les ha prescrito una medicación antihipertensiva para una indicación diferente de la hipertensión (por ejemplo

bloqueadores beta para profilaxis de migraña) sin historia clínica de hipertensión no se considerará que tengan ya sea hipertensión o hipertensión controlada. La intensidad del régimen de tratamiento está definida como el número total de medicaciones antihipertensivas utilizadas para controlar la hipertensión. Todas las medicaciones antihipertensivas serán contadas para la indicación de la hipertensión en los sujetos con hipertensión o hipertensión controlada puesto que los efectos antihipertensivos están presentes sin importar la indicación.

Definición de las Medidas de Dislipidemia. La Dislipidemia está definida de acuerdo con las reglas recientes de la National Kidney Foundation Disease Outcomes Quality Initiative (NKF-K/DOQI).22. La dislipidemia está definida como hipertrigliceridemia (TGs ε 500 mg/dl (5.65 mmol/l), hipercolesterolemia (LDL ε 100 mg/dl (2.59 mmol/l)), o sin HDL elevados (sin HDL ε 130 mg/dl (3.36 mmol/l)) en la presencia de TGs elevadas (TGs ε 200 mg/dl (2.26 mmol/l)). La dislipidemia controlada está definida en este estudio como sujetos quienes están recibiendo el manejo farmacológico para una de las dislipidemias establecidas anteriormente que son tratadas exitosamente, y sus valores de lípidos abajo de los umbrales descritos en el párrafo previo. Algunos de estos agentes tienen precauciones y/o advertencias específicas con respecto a la dosis de inicio o la dosis recomendada máxima

con el uso concomitante de CsA, la dosificación con insuficiencia renal o puede provocar alteraciones de CsA PK. Se hará referencia en el inserto de empaque apropiado para las recomendaciones específicas. Cualquier otro agente (es decir, una terapia sin estatinas) utilizado como un antihiperlipidémico será considerado como la intensidad de tratamiento del nivel 1. El uso concomitante de una estatina y un agente de otra clase (por ejemplo, ezetimiba) elevará el nivel de intensidad de la terapia de estatinas al nivel 1; por lo tanto más de 5 niveles de intensidad son posibles.

El rechazo agudo será definido como un evento clínico-patológico que requiere evidencia clínica y confirmación por biopsia. Las biopsias del aloinjerto serán evaluadas para verificar la presencia y la severidad del rechazo agudo por un patólogo independiente central en los estudios protegidos utilizando la clasificación de trabajo Banff 97 de la patología del trasplante del riñón. En los análisis del rechazo agudo, la interpretación y graduación de la biopsia por el patólogo central reemplazará la interpretación local. Las biopsias efectuadas para un rechazo agudo sospechoso que no satisfagan totalmente los criterios, pero que sean interpretados por el patólogo central como el rechazo agudo y conduzcan al tratamiento para el rechazo agudo, serán contados como el rechazo agudo. El rechazo subclínico está definido como los descubrimientos histológicos por el

patólogo central consistentes con el rechazo agudo, pero que carecen de su correlación clínica. El rechazo agudo resistente a los esteroides está definido como la falta de mejora en el SCr y/o los descubrimientos biológicos que resultan del uso de la terapia de agotamiento de linfocitos después del tratamiento con corticosteroides. Valor de Riesgo de Framingham. Este Valor de riesgo utiliza los datos del Estudio 23 del Corazón de Framingham para estimar el riesgo a los 10 años para la enfermedad de las coronarias "duras" del corazón (infarto de miocardio y muerte coronaria). Los factores de riesgo incluidos en este cálculo son la edad, sexo, colesterol total, colesterol de HDL, SBP, diabetes, tratamiento para hipertensión, y cualquier uso del cigarro en el mes previo.

Determinación del Tamaño de la Muestra

El objetivo primario es estimar el efecto de L104EA29YIg sobre las tasas de supervivencia del injerto y del sujeto y la función renal a los 12 meses cuando se compara con CsA. Los 2 puntos finales co-primarios son: (1) la proporción de los sujetos con un injerto de supervivencia a los 12 meses post-trasplante y (2) la proporción de sujetos cuyo GFR medido a los 12 meses sea < 60 ml/minuto/1.73 m^2, y/o cuyo GFR medido es $\geq$ 10 ml/minuto/1.73 m^2 desde el mes 3 hasta el mes 12. Un tamaño de la muestra de 180 sujetos para el grupo de tratamiento producirá 83 % de confianza para averiguar que

la parte superior unida del CIs de 2 lados, del 97.3 % para la diferencia absoluta (entre cada régimen de L104EA29YIg y el régimen de CsA) en el primer punto final co-primario (supervivencia del sujeto y el injerto) no excederá 10 %, si la tasa de supervivencia verdadera del sujeto y el injerto a los 12 meses es del 80 % para el régimen de CsA y 83 % para cada uno de los 2 regímenes de L104EA29YIg. Para el punto final de la función renal, el tamaño de la muestra de 180 sujetos por grupo es potencializado para detectar una reducción del 25 % en la proporción de los sujetos que satisfacen el punto final de GFR medido para cada régimen de L104EA29YIg cuando se compara con el régimen de CsA, suponiendo que 75 % de los sujetos de CsA satisfacen el punto final de la función renal y 25 % de los abandonos por grupo de tratamiento. En total, 180 sujetos por grupo de tratamiento ofrecerán al menos 80 % de la potencia para detectar 1 régimen de L104EA29YIg que satisface ambos puntos finales co-primarios con el error del Tipo I total controlado al nivel significativo de 0.5 (ajuste de Dunnett).

Criterios de Inclusión

Población Objetivo. 1) El sujeto es un receptor de primera vez de un trasplante de riñón de donador fallecido. 2) el donador y/o el riñón del donador satisfacen al menos 1 de los siguientes criterios extendidos para la donación de órganos: a) Edad del donador $\geq$ 60 años O b) Edad del donador

de 50 - 59 años y 1 de los siguientes: (i) Accidente cerebrovascular (CVA) + hipertensión + SCr > 1.5 mg/dl O (ii) CVA + hipertensión O (iii) CVA + SCr > 1.5 mg/dl O (iv) hipertensión + SCr > 1.5 mg/dl O c) CIT $\geq$ 24 horas, edad del donador > 10 años O d) donador con muerte cardiaca (donador de corazón sin latido), 3) hombres y mujeres, edades de 18 y más viejos, inclusive 4) WOCBP debe utilizar un método adecuado de contracepción para evitar el embarazo en todo el estudio y durante hasta 8 semanas después del estudio de tal manera que el riesgo de embarazo sea minimizado. WOCBP incluye cualesquiera mujeres que hayan experimentado la menarquía y quienes no hayan padecido esterilización quirúrgica exitosa (histerectomía, ligadura entubada bilateral, u oferectomía bilateral) o que no esté post-menopáusica (definida como amenorrea $\geq$ 12 meses consecutivos; o mujeres en terapia de reemplazo de hormonas con un nivel de la hormona estimulante de los folículos en el suero documentado (35 mIU/ml). Aún las mujeres que están usando hormonas orales, implantadas, o contraceptivas inyectables o productos mecánicos tales como un dispositivo intrauterino o métodos de barrera (diafragma, condones, espermicidas) para prevenir el embarazo o la práctica de la abstinencia o en donde la pareja sea estéril (por ejemplo, vasectomía), deben ser considerados que van a ser parejas potenciales para encargar niños. WOCBP debe tener una prueba de embarazo en el

suero negativa (sensibilidad mínima 25 IU/L o unidades equivalentes de la gonadotropina coriónica humana (HCG)) dentro de las 72 horas previas al inicio de la medicación de estudio. 5) Los hombres deben utilizar un método de contracepción adecuado en todo el estudio, y durante hasta 8 semanas después de la última infusión, de modo que el riesgo de embarazo hacia su pareja sea minimizado.

Criterios de Exclusión

1) WOCBP que está renuente o fue incapaz de utilizar un método aceptable para evitar el embarazo durante el período de estudio completo y durante hasta 8 semanas después de la última infusión. 2) Mujeres que están embarazados o alimentando con el pecho. 3) Mujeres con prueba de embarazo positiva durante el enrolamiento o previo a la administración del fármaco de estudio. 4) Hombres que están renuentew o que fueron incapaces de utilizar un método de contracepción adecuado durante el período de estudio completo y durante hasta 8 semanas después de la última infusión. 5) Edad del donador < 10 años. 6) Sujetos con enfermedad renal subyacente de: a) glomeruloesclerosis segmentada focal primaria (probada por biopsia), b) Glomerulonefritis membranoproliferativa del Tipo I o II, c) Síndrome urémico hemolítico (HUS)/síndrome de púrpura trombocitopénica trombótica. 7) sujetos con una PRA actual $\geq$ 30%, 8) sujetos con una correspondencia cruzada linfocitotóxica de las células T positiva. 9) Sujetos con

cualquier trasplante de órganos sólidos previos (incluyendo del riñón), 10) Sujetos que reciben un trasplante de órgano sólido (corazón, hígado, páncreas) o de células (islotes, médula ósea, células madre) concurrente. 11) sujetos que reciben riñones por parejas de un donador de criterio extendido (trasplantes de riñón dobles). 12) Sujetos que son conocidos como positivos al anticuerpo C de la hepatitis o positivos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la hepatitis C. 13) Sujetos que son positivos al antígeno de la superficie de la hepatitis B o positivos de PCR para la hepatitis B. 14) Sujetos con infección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) conocida. 15) sujetos con tuberculosis activa (TB) que requieren tratamiento dentro de los 3 años previos o cualquier sujeto que previamente requirió una terapia combinada triple (o mayor) para TB. Los sujetos con un derivado de proteína purifica positiva (PPD) conocida no serán elegibles para el estudio a menos que los mismos complementaran el tratamiento para TB latente y que tengan una placa de rayos X del pecho negativos en el tiempo del enrolamiento. La prueba de PPD hecha dentro del transcurso de los últimos 12 meses es aceptable siempre que exista la documentación de los resultados. Los sujetos sin una PPD en los últimos 12 meses que tuvieron un resultado negativo previo pueden ser enrolados si los mismos también tuvieron una placa de rayos X negativa del pecho en el

enrolamiento, sin síntomas indicativos de TB, sin contactos de TB conocidos, que no estén radicando actualmente en, hayan viajado recientemente a, o hayan inmigrado previamente de un área endémica de TB. Una respuesta de PPD que es ≥ que una inducración de 10 mm o un valor de Heaf de > 1 en sujetos no inmunizados con el Bacillo de Calmette-Guérin (no-BCG) o > 2 en sujetos inmunizados con BCG deben ser considerados como una prueba positiva. Los criterios más conservadores pueden ser aplicados de acuerdo con las reglas publicadas y/o los estándares locales aprobados po la sociedad médica. 16) sujetos con cualquier infección activa u otra contraindicación que pudieran excluir normalmente el trasplante. 17) Sujetos cuya esperanza de vida está limitada severamente por el estado de la enfermedad u otra condición médica subyacente. 18) sujetos con una historia de cáncer (diferente de los cánceres de las células de la piel sin melanomas curadas por resección local) dentro del transcurso de los últimos 5 años. 19) sujetos con una historia de abuso de substancias (drogas o alcohol) dentro de los últimos 5 años, o trastornos psicóticos que no son compatibles con el seguimiento del estudio adecuado, 20) sujetos con una enfermedad de úlcera péptica activa, diarrea crónica, o mala absorción gastrointestinal, 21) Sujetos con valores de laboratorio locales que son del Grado II o mayores de los Criterios de Toxicidad Comunes (CTC) no participan en el

estudio. Sin embargo, ciertos parámetros de laboratorio especificados que son excepciones al grado II de CTC serán permitidos. Se señalan las siguientes condiciones permitidas: Hematología: la hemoglobina puede estar abajo del Grado II de CTC (pero no abajo de 8 g/dl). Las plaquetas pueden estar abajo del Grado II de CTC, pero no abajo de 80,000/mm3 (80 x 109/l), el conteo de las células blancas de la sangre totales (WCB) puede estar abajo del Grado II de CTC, pero no abajo de 3000/mm3 (3 x 109/l), los conteos de granulocitos y linfocitos pueden estar en cualquier valor. Química; los valores de SCr y del nitrógeno de la urea de la sangre (BUN) pueden ser cualquier valor. La glucosa en sangre puede ser cualquier valor. Urianálisis; los resultados del urianáisis pueden ser cualquier valor, 22) Todas las mujeres de 40 años o más y las mujeres de cualquier edad que tengan grados relativos con una historia de carcinoma de mama y quienes tengan otros factores de riesgo de carcinoma de mama, deben tener un mamograma de exploración, o resultados previos de un mamograma de exploración efectuado dentro de los 6 meses de enrolamiento. Las personas con un mamograma que es sospechoso de malignidades y en quienes la posibilidad de la malignidad no pueda ser excluida razonablemente a continuación de las evaluaciones clínicas, de laboratorio, u otros diagnósticos, adicionales, serán excluidas. Si el mamograma de exploración no fue efectuado dentro de los 6 meses del enrolamiento, pero

la persona es considerada un candidato de trasplante adecuado por criterios locales, el mamograma de la línea base puede ser obtenido dentro de 4 semanas después del trasplante, 23) Sujetos quienes tengan dificultad de acceso por i.v. u otras razones que podrían evitar probablemente la evaluación del punto final co-primario del GFR medido o sujetos que es improbable (pro ejemplo debido a asuntos de coagulación pre-existentes) o que estén renuentes a padecer el protocolo especificado de 12 meses de la biopsia del aloinjerto, 24) Sujetos con una historia de alergia verdadera a agentes de contraste de rayos X yodados por i.v., 25) Sujetos que hayan utilizado cualquier fármaco en investigación dentro de 30 días previo al día de visita 1, 26) Sujetos tratados previamente con L104EA29YIg, 27) Prisioneros o sujetos que sean detenidos compulsivamente (encarcelados involuntariamente) para tratamiento de ya sea una enfermedad psiquiátrica o física (por ejemplo enfermedad infecciosa) no deben ser enrolados en este estudio.

Administración de L104EA29YIg

El día 1 está definido como el día del trasplante (Día 0 post-trasplante). La infusión de la dosis del día debe empezar después de que el cirujano haya hecho una anestesia intraoperativa, y haya concluido que el sujeto permanece como un candidato al trasplante y el trasplante procederá, y antes de empezar la anastomosis vascular del trasplante. Las dosis

de infusión estarán basadas en el peso del cuerpo actual del sujeto en el día 1 de estudio, y no será modificado durante el curso del estudio, a menos que exista un cambio del peso corporal ± 10%. El fármaco de estudio debe ser administrado al sujeto a una velocidad relativamente constante arriba de 30 minutos. Las dosis del dia 1 y del día 5 (día 4 post-trasplante) deben ser administradas aproximadamente a un intervalo de 96 horas de separación (± 6 horas). Las ventanas de infusión y de visitas subsiguientes son provistas posteriormente. Para sujetos con diálisis, la infusión de L104EA29YIg y la determinación del peso del sujeto deben ocurrir después del tratamiento de la diálisis.

Regímenes de MI de L104EA29YIg. Los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto al régimen de MI recibirán i.v. el L104EA29YIg (10 mg/kg) los días 1 y 5, y luego cada otra semana durante 2 meses (semanas 2, 4, 6, 8, 10, y 12), y luego cada 4 semanas hasta los 6 meses (semanas 16, 20, y 24). Después de 6 meses, los sujetos en el grupo de tratamiento de MI recibirán L104EA29YIg a la dosis de mantenimiento de 5 mg/kg cada 4 semanas hasta el complemento del ensayo a los 36 meses.

Regímenes de LI de L104EA29YIg. Los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto al régimen de LI recibirán i.v. el L104EA29YIg (10 mg/kg) los días 1 y 5, y luego cada otra semana durante 2 meses (semanas 2 y 4), y luego cada 4

semanas durante 2 meses (semanas 8 y 12). Después de 3 meses, los sujetos en el grupo de tratamiento de LI recibirán L104EA29YIg a la dosis de mantenimiento de 5 mg/kg cada 4 semanas hasta el complemento del ensayo a los 36 meses. La protección u ocultamiento entre los grupos de LI y MI será preservado con el uso de 2 infusiones de placebo en el grupo de tratamiento de LI. Por lo tanto, los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto al régimen de LI serán administrados con placebo (dextrosa al 5 % en infusiones de agua para inyección (D5WJ) en las semanas 6 y 10.

Administración de ciclosporina (CsA)

El uso diaria de CsA debe ser administrado en 2 dosis divididas en un programa consistente con relación al tiempo del día y los alimentos. En los días de visita del estudio, el sujeto debe resistir la dosis de CsA de la mañana hasta después de las extracciones del nivel de sangre de CsA reducido. En los días de visita del estudio, cuando el sujeto está teniendo evaluaciones de GFR medido y/o verificación de BP estandarizado, estas medidas van a ser complementadas previo a la dosificación de CsA, La dosis diaria inicial debe ser de 7 $\pm$ 3 mg/kg (es decir, 4-10 mg/kg). Las dosis subsiguientes deben ser ajustadas para mantener un intervalo predefinido de concentraciones reducidas en el suero: 1/er. mes: nivel objetivo 150-300 ng/ml. Después del 1/er. mes: nivel objetivo de 100-250 ng/ml. Verificación de los niveles

de CsA utilizando la post-dosis de 2 horas de concentración en el plams (C2) no va a ser utilizada en este estudio. Aunque una declaración de consentimiento internacional sobre el manejo de Neoral por verificación de C2 favoreció el uso de la verificación de C2, también está establecida claramente la falta de datos con respecto a los efectos a largo plazo sobre el funcionamiento renal, la incidencia de CAN, y el perfil de seguridad general asociada con la verificación de C2 asociada. Además, no todos los sujetos son adecuados para la verificación de C2, incluyendo sujetos con diabetes, con vaciado gástrico lento, o sujetos que utilizan una medicación concomitante que altera la depuración de CsA. Además, los niveles bajos de C2 pueden resultar de ya sea la absorción baja verdadera (en la cual la dosis de CsA debe ser incrementada) o de la absorción lenta (en la cual existe una concentración máxima en el plasma retardada y un incremento en la dosis puede producir toxicidad). Finalmente, esta práctica no es universal, y la validación prospectiva de esta práctica va más allá del alcance del presente protocolo. Para información de prescripción adicional, véase el inserto del empaque. CsA debe ser iniciado en todos los sujetos el día 7. Para sujetos en quienes el investigador cree que no es del mejor interés del sujeto iniciar CsA para nada (por ejemplo debido a función renal alterada), y elijan utilizar una medicación que no está en estudio (por ejemplo sirolimus) en

lugar de la misma, esta acción será considerada una detención de la medicación de estudio.

Para sujetos con función de aloinjerto inmediata. Para los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto al tratamiento con CsA, la primera dosis de CsA debe ser administrada tan pronto, pero no hasta que, exista una evidencia de función de aloinjerto adecuada. La función de aloinjerto adecuada está definida como una reducción en el SCr de al menos 1 mg/dL comparado con el valor post-trasplante inicial o la salida de orina $\geq$ 250 ml en un período de 12 horas (o menor) post-trasplante.

Para sujetos con función de aloinjerto renal alterada y DGF anticipado. Los sujetos con aloinjerto alterado post-operativo y con DGF anticipado, son elegibles - pero no requeridos - para recibir una preparación de antilinfocitos policlonal. Ya sea que un sujeto reciba o no una preparación de linfocitos policlonales, CsA debe ser iniciado cuando exista evidencia de recuperación de la función del aloinjerto (como se definió anteriormente) o por el día 7.

Corticosteroides

Todos los sujetos en este estudio serán tratados con corticosteroides diariamente. Reducción gradual-mantenimiento con esteroides. El día del trasplante (día 1): metil prednisolona (como succinato de sodio) 500 mg i.v. en la llegada a la sala de operaciones (OR).

Día 2: metil prednisolona (como succinato de sodio) 250 mg i.v.

Día 3: prednisona (o prednisolona) 100 mg oralmente (p.o.).

Día 4 al día 14 (es decir, el fin de semana 2); reducción gradual de prednisona (o prednisolona) a 20-30 mg p.o. diariamente.

Día 15 hasta el mes 6: reducción gradual de prednisona (o prednisolona) no inferior que 2.5 mg p.o. diariamente.

Los sujetos deben permanecer en al menos 2.5 mg p.o. diariamente hasta el año 3.

Las primeras 2 dosis (día de estudio 1, día del trasplante y día de estudio 2, día post-operativo 1) van a ser administradas i.v. Las dosis restantes van a ser administradas p.o. Sin embargo, la dosificación i.v. de una dosis equivalente de metil prednisolona es permitida en tiempos cuando la dosificación oral no es posible. Tales razones para la dosificación i.v en lugar de p.o. son enfermedad intercurrente, íleo post-operativo, u otras causas a discreción del investigador. Si la metil prednisolona no está disponible, el uso de otro agente de corticosteroides i.v. equivalente a la dosis de metil prednisolona es permitido.

Dosificación de Micofenolato mofetilo

Todos los sujetos en este estudio fueron tratados con

MMF. El MMF diario debe ser administrado en 2 dosis divididas sobre un programa consistente con relación al tiempo del día y los alimentos. La dosis debe ser 2 g diariamente; sin embargo, en afro-americanos, 3 g diariamente pueden ser administrados a criterio del investigador. Se debe administrar 25 MMF p.o. La dosificación intravenosa es permitida si es necesaria debido a la enfermedad intercurrente, íleo post-operativo, u otras causas a criterio del investigador. La primera dosis debe ser administrada pre-operativamente. Las dosis subsiguientes deben ser administradas p.o. tan pronto como el sujeto sea capaz de tolerar medicaciones por la boca. La dosis y el programa pueden ser determinados de manera ajustada con base a los valores de laboratorio (por ejemplo, WBCs reducidos) y la capacidad de tolerancia del sujeto (véase posteriormente). Para información de prescripción completa, véase el inserto del empaque.

Para sujetos que desarrollan naúseas, diarrea, u otros efectos adversos gastrointestinales relacionados con MMF (por ejemplo, síntomas considerados y evaluados totalmente que no tienen una etiología diferente que la intolerabilidad a MMF), la dosis de MMF puede ser reducida hasta la dosis tolerada de manera máxima. Para sujetos que desarrollan neutropenia (conteo absoluto de neutrofilos < 1.3 x 103/(L), la dosificación con MMF debe ser interrumpida o la dosis

reducida tal como lo indica en el inserto del empaque.

Dosificación de basiliximab

Todos los sujetos en este estudio fueron tratados con el régimen de dosificación recomendado de basiliximab. El basiliximab debe ser administrado por medio de una vena periférica o central solamente. El basiliximab reconstituido (20 mg en 5 ml) debe ser diluido hasta un volumen de 50 ml con dextrosa o solución salina normal al 5 % y se administra como una infusión i.v. durante 20-30 minutos. La primera dosis de 20 mg debe ser administrada el día 1 (el día del trasplante, día 0 post-operativo). Para los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto a L104EA29YIg, esta primera infusión de basiliximab debe ocurrir tan pronto como sea posible después del complemento de la infusión de L104EA29YIg. La segunda dosis de 20 mg debe ser provista el día 5 (día post-operativo 4). La segunda dosis de basiliximab no debe ser administrada a los sujetos si los mismos han recibido o están expuestos a recibir un tratamiento de agotamiento de linfocitos. Para información adicional véase el inserto del empaque.

Preparaciones de antilinfocitos policlonales para una función de aloinjerto renal alterada y DGF anticipado

El uso de preparaciones de antilinfocitos policlonales (timoglobulina o ATGAM) es permitido - pero no requerido - para sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto a CsA

que experimentan una función de aloinjerto renal alterada y DGF anticipado después del trasplante. El uso de otras preparaciones de antilinfocitos policlonales o de globulinas de antitimocitos policlonales es permitido en regiones en donde existe la autorización del mercado, y si las mismas están indicadas para el tratamiento del rechazo agudo en el trasplante renal. Debe señalarse que OKT3 no va a ser utilizado para este propósito, pero puede ser utilizado para el tratamiento del rechazo agudo resistente a los esteroides o el rechazo agudo más grande o de grado IIb de Banff 97. El uso de Campath 1-H® (alemtuzumab) no es permitido en este protocolo, porque no está indicado para su uso en el trasplante de riñón. Estos agentes son utilizados ampliamente en esta capacidad para producir la inmusupresión hasta que la función del injerto permita la administración de CsA. Por lo tanto, las preparaciones de antilinfocitos policlonales pueden ser utilizadas en este medio clínico, a criterio del investigador, en sujetos que satisfagan $\geq$ 1 de los siguientes criterios que son observados en la presencia de una vena o arteria de trasplante patente y ninguna evidencia de hidronefrosis por sonograma: a) salida de la orina < 250 cc/12 horas; b) ninguna mejora significativa (< 1 mg/dL) en SCr desde el valor de la línea base durante las primeras 24-72 horas post-trasplante; c) tratamiento de diálisis. El uso de estos agentes para la función del aloinjerto renal

alterada y DGF anticipado no está permitido en pacientes tratados con L104EA29YIg.

Dosificación de sulfametoxazol/trimetoprima

Todos los sujetos que participaron en este estudio que no tuvieron contraindicaciones deben recibir profilaxis con sulfametoxazol/trimetoprima para prevenir infecciones en el tracto urinario por Pneumocystis carinii. La dosificación y administración va a ser determinadas por el nivel de la función renal consistente con el inserto de empaque. Los sujetos con una contraindicación o intolerancia hacia los fármacos de sulfa o de trimetoprima pueden recibir terapia profiláctica con pentamidina inhalada a criterio del investigador. Para la información de prescripción total, véase el inserto del empaque.

Dosificación de Valganciclovir/Ganciclovir, aciclovir/Valaciclovir. Todos los receptores que no tienen contraindicaciones para valganciclovir, ganciclovir, aciclovir y valaciclovir deben ser tratadas profilácticamente con estos fármacos para prevenir infecciones debido a CMV y Herpes simplex. Las siguientes son reglas para la dosificación y duración del tratamiento profiláctico:

Profilaxis para los primeros 10 días post-trasplante o durante la terapia de agotamiento de las células T

Todos los sujetos del trasplante recibirán Valganciclovir o ganciclovir por protocolo durante 10 días

después de la cirugía. Sin son tratados con una terapia de agotamiento de las células T para inducción de la terapia o tratamiento para el rechazo agudo, el sujeto recibirá valganciclovir o ganciclovir por la duración de la terapia de agotamiento de las células T. Si el sujeto es descargado previo a los 10 días, se empezará el suministro de valganciclovir, ganciclovir, valaciclovir, o aciclovir oral basado en el estado inmune de CMV como es descrito posteriormente.

Valganciclovir para profilaxis: Depuración de creatinina $\geq$ 60 ml/minuto, dosificación de 900 mg diariamente; Depuración de creatinina 40 - 59 ml/minuto, dosificación de 450 mg diariamente; Depuración de creatinina < 40 ml/minuto, dosis de 450 mg cada uno de los otro días.

Ganciclovir para profilaxis: si el sujeto es incapaz de tolerar las medicaciones orales, o el valganciclovir no está disponible para su uso, puede ser substituido por cápsulas o una suspensión de ganciclovir. Depuración de creatinina $\geq$ 70 ml/minuto, dosificación 1 a 3 veces diariamente; depuración de creatinina 50 - 69 ml/minuto, dosis de 500 mg 3 veces diariamente; depuración de creatinina 25 - 49 ml/minuto, dosis de 500 mg, dos veces diariamente; depuración de creatinina 10 - 24 ml/minuto, dosis de 500 mg diariamente; depuración de creatinina < 10 ml/minuto, dosis de 500 mg después de hemodiálisis 3 veces por semana. Si el ganciclovir

i.v. es necesario, véase el inserto del empaque para la dosificación.

Profilaxis después de 10 días post-trasplante hasta al menos 3 meses:

El donador seropositivo de anticuerpos de CMV a un receptor seronegativo de anticuerpos de CMV: continuar el protocolo de valganciclovir o ganciclovir listado anteriormente durante $\geq$ 3 meses.

Donador seropositivo o seronegativo de anticuerpos/CMV a un receptor seropositivo de anticuerpos de CMV: aciclovir oral durante $\geq$ 3 meses post-trasplante: creatinina en el suero $\geq$ 50 ml/minuto, dosis de 800 mg oralmente 4 veces al día; creatinina en el suero 25-49 ml/minuto, dosis de 800 mg oralmente 3 veces al día; creatinina en el suero 11-24 ml/minuto, dosis de 800 mg oralmente dos veces al día; creatinina en el suero < 10 ml/minuto; dosis de 800 mg oralmente cada día; en la hemodiálisis, dosis de 800 mg diariamente después de la hemodiálisis.

El valaciclovir puede ser substituido por el aciclovir en el tiempo de la descarga por razones de conveniencia para el sujeto. La creatinina en el suero $\geq$ 50 ml/minuto, dosis de 500 mg oralmente 2 veces al día, creatinina en el suero 25 - 49 ml/minuto, dosis de 500 mg oralmente cada día; creatinina en el suero 11-24 ml/minuto, dosis de 500 mg oralmente cada día; creatinina en el suero < 10 ml/minuto, dosis de 250 mg

oralmente cada día; en la hemodiálisis, dosis de 250 mg diariamente después de la hemodiálisis.

Donador seronegativo con anticuerpos de CMV a un receptor seronegativo con anticuerpos CMV: Protocolo de aciclovir oral necesario para profilaxis por herpes solamente: continúe durante > 3 meses post-trasplante. Aciclovir 400 mg p.o. dos veces al día o el valaciclovir puede ser substituido por aciclovir en el tiempo de descarga por razones de conveniencia. Para información de prescripción total, se hace referencia a los insertos del empaque.

Procedimientos de visita solamente para infusión: a) Para sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto al tratamiento de L104EA29YIg: una prueba de embarazo negativa es requerida previo a la administración de L104EA29YIg. La dosis va a estar basada en el peso del sujeto en la visita del estudio previo más reciente. Los sujetos deben ser verificados en sus signos vitales (pre y post-infusión), y el AEs debe ser evaluado. Las muestras de PK pueden ser requeridas en algunas visitas. b) Para los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto al tratamiento de CsA: los sujetos serán contactados para la evaluación de AEs solamente. Esta visita puede ser un contacto telefónico, y debe ocurrir dentro de la ventana de visita prescrita para la visita especificada.

Ventana de la visita

a) Para sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto al tratamiento de L104EA29YIg: las dosis de los días 1 y 5 deben ser administradas aproximadamente con una separación de 96 horas (± 6 horas). Para facilitar la programación de las visitas solamente para infusión, las siguientes ventanas son permitidas para las dosis subsiguientes: semana de visita 2, fecha objetivo de la ventana de visita ± 2 días; semana de visita 4 - fecha objetivo de la ventana de visita del mes 6 ± 3 días, mes de visita 7 - mes 36, fecha objetivo de la ventana de visita ± 5 días, visita de seguimiento a las 8 semanas, fecha objetivo de la ventana de visita ± 5 días.

b) Para los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto al tratamiento CsA: después del día 5, los sujetos solamente se requiere que atiendan las visitas clínicas en las semanas 2, 4, 8, y 12; luego en cada visita de intervalo de 3 meses. En las visitas de intervalos que son diferentes de 3 meses (es decir, semanas 6, 10, 16, 20, 28, 32, etc.), un contacto telefónico será establecido para colectar la información de AE. Las visitas clínicas y de contacto ocurrirán dentro de las mismas ventanas de visita que se especificó anteriormente para los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto a L104EA29YIg. Las fechas objetivo para las evaluaciones de GFR de 3 y 12 meses son la semana 12 ± 14 días y la semana 52 ± 14 días. Bajo ciertas

circunstancias, y con la aprobación previa del monitor médico, las evaluaciones de GFR medidas en el mes 3 y el mes 12 pueden ser llevadas a cabo hasta el mes 6 y el mes 15, respectivamente. Tales razones que pueden garantizar la extensión de una evaluación de GFR medido incluyen la presencia de un episodio de rechazo agudo recurrente o la necesidad de repetir una evaluación por razones técnicas.

La fecha objetivo para la biopsia del aloinjerto de 12 meses es la semana 52 $\pm$ 14 días. De manera semejante, bajo ciertas circunstancias y con la aprobación previa del monitor médico, la biopsia del aloinjerto puede ser obtenida dentro del mes 15. Tales razones que pueden asegurar la extensión de una biopsia del aloinjerto incluyen la necesidad temporal para la anticoagulación.

Ejemplo 5

Una persona experta en el arte podría utilizar el programa de administración descrito anteriormente en el ejemplo 4 para diseñar un estudio que comprenda una población diferente de estudio, criterios del donador y/u objetivos. Por ejemplo, este estudio del trasplante evaluará a los sujetos que reciben un trasplante de riñón de un donador vivo o de un donador fallecido con un tiempo isquémico por enfriamiento anticipado < 24 horas. Los sujetos en niveles variables de riego inmunológico serán elegibles. Sin embargo, el estudio excluirá a los sujetos de riesgo inmunológico más

grande. Los sujetos serán distribuidos aleatoriamente con respecto a las ramificaciones de MI, LI o CsA como se describió anteriormente en el ejemplo 4.

Objetivos primarios

Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre el elemento compuesto de la supervivencia del sujeto y el injerto por 12 meses. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre el elemento compuesto del GFR medido < 60 ml/minuto/1.73 m^2 en el mes 12 o una reducción en el GFR medido $\geq$ 10 ml/minuto/1.73 m^2 desde el mes 3 hasta el mes 12. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la incidencia del rechazo agudo por 12 meses.

Objetivos secundarios

Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre el GFR medido a los 12 meses. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre CAN probado por biopsia a los 12 meses. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre los componentes individuales del punto final de la composición primaria del GFR medido < 60 ml/minuto/1.73 m^2 en el mes 12 o una reducción en el GFR medido > 10 ml/minuto/1.73 m^2 desde el mes 3 hasta el mes 12. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre el punto final del compuesto triple de la muerte, pérdida del injerto, y rechazo agudo, por los meses 12, 24, y 36. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la

proporción de sujetos con un GFR medido < 60 ml/minuto/1.73 m^2 a los 24 meses. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre el GFR medido a los 3 y 24 meses, y cambiar desde la línea base (3 meses) hasta 12 meses y hasta 24 meses. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la proporción de sujetos con un GFR medido < 30 ml/minuto/1.73 m^2 a los 12 y 24 meses. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre el GFR calculado a los 6, 12, 24, y 36 meses, y cambiar desde 6 meses hasta 12, 24 y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre PTDM por 12, 24, y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre las mediciones de hipertensión a los 12, 24, y 36 meses, incluyendo SBP y DBP, la incidencia y prevalecencia de la hipertensión y la hipertensión controlada, y la intensidad del régimen de tratamiento. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre las mediciones de la dislipidemia, a los 12, 24, y 36 meses, incluyendo lipoproteínas de densidad baja (LDL), diferentes de HDM, en el suero total, y colesterol de HDL, y TGs, la incidencia y prevalecencia de dislipidemia y dislipidemia controlada, y la intensidad del régimen de tratamiento. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la supervivencia del sujeto y el injerto por 24 y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la proporción de sujetos con un GFR calculado <

60 ml/minuto/1.73 m^2 a los 24 y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre las mediciones de rechazo agudo por los meses 6, 12, 24 y 36, incluyendo la incidencia y la severidad del rechazo agudo, el uso de preparaciones de antilinfocitos policlonales para una función renal alterada y una función del injerto retardada anticipada (DGF), el uso inicial de la terapia de agotamiento de linfocitos para el tratamiento de rechazo agudo, la incidencia del rechazo agudo resistente a los esteroides, la incidencia de la recuperación completa (SCr regresando a la línea base) después del rechazo agudo, la incidencia del rechazo subclínico, la incidencia de todos los episodios de rechazo agudo tratados sin importar los descubrimientos histológicos, y el tiempo hasta el inicio del rechazo agudo. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre QoI. Evaluar la seguridad total de L104EA29YIg, con relación a CsA. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la pendiente e intersección del GFR calculado desde los 3 meses hasta los 12, 24, y 36 meses. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la proporción de sujetos con GFR calculado < 60 ml/minuto/1.73 m^2 en el mes 12 o los sujetos con una reducción en el GFR calculado desde el mes 3 hasta el mes 12 de al menos 10 ml/minuto/1.73 m^2. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la incidencia de DGF. Evaluar los

efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la proporción de sujetos con una enfermedad crónica del riñón desde la etapa 1 hasta la etapa 5 en los meses 12 y 24 como se evaluó por GFR medido. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la proporción de sujetos con una enfermedad crónica del riñón desde la etapa 1 hasts la etapa 5 a los 36 meses como se evaluó por GFR calculado. Evaluar los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre un punto final de la enfermedad cardiovascular compuesta (muerte vascular adjudicada, infarto de miocardio, ataques isquémicos, y procedimientos de revascularización (quirúrgicos o percutáneos)) por los meses 12, 24, y 36. La evaluación de los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre un punto final de la enfermedad cardiorrenal compuesta (muerte, pérdida de injerto, infarto de miocardio no fatal, y ataques) por 12, 24, y 36 meses. La evaluación de los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la Evaluación del Riesgo de Framingham a los 12, 24, y 36 meses. La evaluación de los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la incidencia de la detención del fármaco de estudio. La evaluación de los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre los anticuerpos del antígeno del leucocito humano anti-donador (HLA). La evaluación de los efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre los anticuerpos del receptor (ATI) del tipo 1 de la angiotensina II. La evaluación de los

efectos de L104EA29YIg, con relación a CsA, sobre la positividad de C4d en los especímenes con biopsia.

Diseño de Estudio

La duración del estudio es de 3 años con un período de seguimiento de 8 semanas subsiguiente, para evaluaciones de seguridad. Este es un estudio de grupo paralelo, controlado de manera activa, parcialmente protegido, aleatorio. Todos los sujetos recibirán un trasplante de riñón de un donador vivo o de un donador fallecido con un CIT anticipado < 24 horas.

Aproximadamente 660 sujetos serán distribuidos aleatoriamente con respecto al tratamiento con ya sea L104EA29YIg (régimen MI), L104EA29YIg (régimen LI), o CsA. Todos los sujetos también recibirán la inducción con basalizimab y un régimen inmunosupresor de mantenimiento base de MMF y corticosteroides. Los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto al régimen de MI recibirán i.v. L104EA29YIg (10 mg/kg) en los días 1 y 5, luego cada 2 semanas hasta el mes 3 (semanas 2, 4, 6, 8, 10, y 12), y luego cada 4 semanas hasta los 6 meses (Semanas 16, 20, y 24). Después de los 6 meses, los sujetos en el grupo de tratamiento de MI recibirán la dosis de mantenimiento de L104EA29YIg de 5 mg/kg administrados cada 4 semanas hasta el complemento del ensayo a los 36 meses. Los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto al régimen de LI

recibirán L104EA29YIg i.v. (10 mg/kg) los días 1 y 5, y luego cada 2 semanas hasta el mes 1 (semanas 2 y 4), y cada 4 semanas hasta el mes 3 (semanas 8 y 12). Después de 3 meses, los sujetos en el grupo de tratamiento de LI recibirán la dosis de mantenimiento de L104EA29YIg de 5 mg/kg administrada cada 4 semanas hasta el complemento del ensayo a las 36 meses. El ocultamiento o protección entre los grupos de LI y MI será preservada con el uso de infusiones de placebo en el grupo de tratamiento de LI a las 6 y 10 semanas. Los sujetos distribuidos aleatoriamente con respecto a CsA recibirán dosis dos veces diariamente que están diseñadas para lograr un intervalo de concentración en el suero reducido especificado consistente con la práctica médica común. La seguridad y eficacia de L104EA29YIg será evaluada a los 1, 2, y 3 años. Un DSMB independiente revisará los datos del estudio sobre una base en curso, y hará recomendaciones para alterar la conducto del ensayo, si es necesario.

Población de Estudio

La población de estudio incluye receptores de aloinjertos renales de donadores vivos o donadores fallecidos con un CIT anticipado < 24 horas. En general, los criterios inmunológicos no desempeñarán un papel principal en la selección del sujeto. Los sujetos a niveles variables de riesgo inmunológico son elegibles. El estudio excluirá, sin embargo, a los sujetos de riesgo inmunológico más grande

(anticuerpos reactivos con el panel actual, de correspondencia cruzada positiva (PRA) de > 50 %, o aquellos trasplantados previamente con una PRA actual ≥ 30%). Estos sujetos pueden requerir terapia para reducir su carga de anticuerpos, tal como plasmaféresis, lo cual está más allá del alcance de este protocolo. Los sujetos serán enrolados en aproximadamente 100 sitios globalmente.

Criterios de Inclusión

Población Objetivo. 1) El sujeto es un receptor de un trasplante de riñón de un donador vivo o de un donador fallecido con un CIT anticipado < 24 horas, 2) Hombres y mujeres, edades de 18 años y más viejos, inclusive, 3) WOCBP debe estar utilizando un método adecuado de contracepción para evitar el embarazo en todo el estudio y durante hasta 8 semanas después del estudio de tal manera que el riesgo de embarazo sea minimizado. WOCBP incluye cualquier mujer que haya experimentado la menarquía y que no haya padecido esterilización quirúrgica exitosa (histerectomía, ligadura entubada bilateral, u oferectomía bilateral) o que no esté post-menopáusica (definida como amenorrea durante 12 meses consecutivos; o mujeres en terapia de reemplazo de hormonas (HRT) con un nivel de la hormona estimulante de los folículos en el suero (FHS) > 35 mIU/ml). Aún las mujeres que están usando hormonas orales, implantadas, o contraceptivas inyectables o productos mecánicos tales como un dispositivo

intrauterino o métodos de barrera (diafragma, condones, espermicidas) para prevenir el embarazo o la práctica de la abstinencia o en donde la pareja sea estéril (por ejemplo, vasectomía), deben ser considerados que van a ser parejas potenciales para encargar niños. WOCBP debe tener una prueba de embarazo en el suero negativa (sensibilidad mínima 25 IU/L o unidades equivalentes de la gonadotropina coriónica humana (HCG)) dentro de las 72 horas previas al inicio de la medicación de estudio.

Criterios de Exclusión

1) WOCBP que está renuente o fue incapaz de utilizar un método aceptable para evitar el embarazo durante el período de estudio completo y durante hasta 8 semanas después de la última infusión. 2) Mujeres que están embarazados o alimentando con el pecho. 3) Mujeres con prueba de embarazo positiva durante el enrolamiento o previo a la administración del fármaco de estudio. 4) Parejas receptoras de donadores genéticamente idénticos (es decir, gemelos). 5) Edad del donador < 10 años. 6) Sujetos que reciben un órgano de un donador como se definió por: a) edad del donador $\geq$ 60 años O; b) edad del donador entre 50-59 años y 1 de los siguientes: (i) Accidente cerebrovascular (CVA) + hipertensión + SCr > 1.5 mg/dl O (ii) CVA + hipertensión O (iii) CVA + Scr > 1.5 mg/dl O (iv) hipertensión + Scr > 1.5 mg/dl O c) CIT anticipado $\geq$ 24 horas O d) donador con muerte cardiaca

(donador sin latido cardiaco). 7) Sujetos con enfermedad renal subyacente de: a) glomeruloesclerosis segmentada focal primaria, b) Glomerulonefritis membranoproliferativa del Tipo I o II, c) Síndrome urémico hemolítico (HUS)/síndrome de púrpura trombocitopénica trombótica. Si un sujeto tiene ESRD de etiología desconocida y/o no tiene diagnóstico confirmado histológicamente, el sujeto puede ser enrolado en el estudio siempre que no existan signos o síntomas consistentes con el diagnóstico clínico de glomerulosis segmentada focal primaria, glomerulonefritis membranoproliferativa del tipo I o II, o HUS, como sea considerado por el investigador. 8) sujetos que padecen trasplante primario (por primera vez) con una PRA actual $\geq$ 50%, o sujetos que padecen retrasplante con una PRA ε 30%. 9) Sujetos con pérdida de injerto previa debido a rechazo agudo. 10) sujetos con una correspondencia cruzada linfocitotóxica de las células T positiva. 11) Sujetos con trasplante de órganos sólidos no renales previos (los sujetos que padecen retrasplante de riñón son elegibles dependiendo de que otros criterios de estudio sean satisfechos), o sujetos que padecen trasplantes de órganos múltiples (por ejemplo, riñón-páncreas) o sujetos que se considera que probablemente tengan un segundo trasplante de células u órganos sólidos (por ejemplo, trasplante de páncreas o islotes) en los siguientes 3 años por el investigador. 12) Sujetos que reciben un trasplante de órgano

sólido (corazón, hígado, páncreas) o de células (islotes, médula ósea, células madre) concurrente. 13) Sujetos que reciben riñones por parejas (trasplantes de riñón dobles o en bloque). 14) Sujetos que son conocidos como positivos al anticuerpo C de la hepatitis o positivos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la hepatitis C. 15) Sujetos que se sabe que son positivos al antígeno de la superficie de la hepatitis B o positivos de PCR para la hepatitis B. 16) Sujetos con infección del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) conocida. 17) sujetos con tuberculosis activa (TB) que requieren tratamiento dentro de los 3 años previos o cualquier sujeto que previamente requirió una terapia combinada triple (o mayor) para TB. Los sujetos con un derivado de proteína purifica positiva (PPD) conocida no serán elegibles para el estudio a menos que los mismos complementaran el tratamiento para TB latente y que tengan una placa de rayos X del pecho negativos en el tiempo del enrolamiento. La prueba de PPD hecha dentro del transcurso de los últimos 12 meses es aceptable siempre que exista la documentación de los resultados. Los sujetos sin una PPD en los últimos 12 meses que tuvieron un resultado negativo previo pueden ser enrolados si los mismos también tuvieron una placa de rayos X negativa del pecho en el enrolamiento, sin síntomas indicativos de TB, sin contactos de TB conocidos, que no estén radicando actualmente en, hayan

viajado recientemente a, o hayan inmigrado previamente de un área endémica de TB. Una respuesta de PPD que es ≤ que una induración de 10 mm o un valor de EFA de > 1 en sujetos no inmunizados con el Bacillo de Calmette-Guérin (no-BCG) o > 2 en sujetos inmunizados con BCG deben ser considerados como una prueba positiva. Los criterios más conservadores pueden ser aplicados de acuerdo con las reglas publicadas y/o los estándares locales aprobados po la sociedad médica. 18) sujetos con cualquier infección activa u otra contraindicación que pudieran excluir normalmente el trasplante. 19) Sujetos cuya esperanza de vida está limitada severamente por el estado de la enfermedad u otra condición médica subyacente. 20) sujetos con una historia de cáncer (diferente de los cánceres de las células de la piel sin melanomas curadas por resección local) dentro del transcurso de los últimos 5 años. 21) sujetos con una historia de abuso de substancias (drogas o alcohol) dentro de los últimos 5 años, o trastornos psicóticos que no son compatibles con el seguimiento del estudio adecuado. 22) sujetos con una enfermedad de úlcera péptica activa, diarrea crónica, o mala absorción gastrointestinal.

La administración de, y las ventanas de visita para los regímenes de MI y LI y CsA de L104EA29YIg, incluyendo una lista cuando se requiera, serán como se describieron anteriormente y en el Ejemplo 4.

Como será evidente para aquellos expertos en el arte al cual pertenece la invención, la presente invención puede ser incluida en formas diferentes de aquellas descritas de manera específica anteriormente sin apartarse del espíritu o características esenciales de la invención. Las modalidades particulares de la invención descrita anteriormente van a ser, por lo tanto, consideradas como ilustrativas y no restrictivas. El alcance de la presente invención es como se describe en las reivindicaciones anexas en lugar de estar limitado a los ejemplos contenidos en la descripción precedente.

REIVINDICACIONES

1. Método para el tratamiento de un trastorno inmune asociado con el trasplante de injerto, caracterizado porque comprende: administrar a un sujeto una dosis efectiva de una molécula mutante de CTLA4 que comprende el dominio extracelular de CTLA4 como se muestra en la SEC ID NO: 8 que empieza con la alanina en la posición 26 o la metionina en la posición 27 y que finaliza con el ácido aspártico en la posición 150, o una porción de la misma, en donde en el dominio o porción extracelular de la misma, una alanina en la posición 55 está substituida con una tirosina, y una leucina en la posición 130 está substituida con un ácido glutámico y en donde el régimen de administración comprende un régimen de fase inicial, en donde el régimen de fase inicial puede variar desde los primeros 3 hasta 6 meses post-trasplante e involucra la administración que inicialmente es más frecuente que mensualmente.

2. Método para el tratamiento de un trastorno inmune asociado con el trasplante de injerto que comprende administrar a un sujeto una dosis efectiva de una molécula mutante de CTLA4, caracterizado porque comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos que empieza con la metionina en la posición 27 y que finaliza con el ácido aspártico en la posición 150 de la SEC ID NO: 4, o

(b) una secuencia de aminoácidos que empieza con la alanina en la posición 26 y finaliza con el ácido aspártico en la posición 150 de la SEC ID NO: 4 y

en donde el régimen de administración de la molécula mutante de CTLA4 comprende un régimen de fase inicial, en donde el régimen de fase inicial puede variar desde los primeros 3 a 6 meses post-trasplante e involucra la administración que inicialmente es más frecuente que mensualmente.

3. Método de conformidad con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el régimen de administración de la fase inicial comprende la administración de la molécula mutante de CTLA4 el día 1, semana 2 de visita, semana 4 de visita, semana 8 de visita y semana 12 de visita.

4. Método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque el régimen de administración de la fase inicial comprende la administración de una molécula mutante de CTLA4 el día 5.

5. Método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el régimen de administración de la fase inicial comprende la administración de la molécula mutante de CTLA4 en la semana 6 de visita, la semana 10 de visita, el mes 4 de visita, el mes 5 de visita o el mes 6 de visita.

6. Método de conformidad con las reivindicaciones 3, 4 ó 5, caracterizado porque el régimen de administración

comprende además un régimen de fase de mantenimiento en donde el régimen de fase de mantenimiento empieza después que el régimen de fase inicial finaliza y en donde la administración de la molécula mutante de CTLA4 no es más frecuente que mensualmente.

7. Método de conformidad con las reivindicaciones 3, 4 ó 5, caracterizado porque la dosis efectiva del mutante de CTLA4 durante la fase inicial es de aproximadamente 10 mg/kg de peso del sujeto.

8. Método de conformidad con la reivindicación 6, caracterizado porque la dosis efectiva de la molécula mutante de CTLA4 durante la fase de mantenimiento es de aproximadamente 5 mg/kg de peso.

9. Método de conformidad con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la dosis efectiva de la molécula mutante de CTLA4 es de aproximadamente 10 mg/kg de peso del sujeto con un régimen de administración que comprende la administración los días 1, 15, 29, 57, 85 y 5 mg/kg mensualmente después de esto.

10. Método de conformidad con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la dosis efectiva de la molécula mutante de CTLA4 es de aproximadamente 10 mg/kg de peso del sujeto con un régimen de administración que comprende la administración los días, 1, 5, 15, 29, 57, 85 y 5 mg/kg mensualmente después de esto.

11. Método de conformidad con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la dosis efectiva de la molécula mutante de CTLA4 es de aproximadamente 10 mg/kg de peso del sujeto con un régimen de administración que comprende la administración los días 1, 5, 15, 29, 43, 57, 71, 85, 113, 141, 169 y 5 mg/kg mensualmente después de esto.

12. Método de conformidad con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque los trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto comprenden el rechazo de órganos sólidos, trasplante de tejidos y/o células.

13. Método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque los trastornos inmunes asociados con el transplante de injerto comprenden el rechazo del trasplante del riñón.

14. Método de conformidad con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque las moléculas mutantes de CTLA4 comprenden además una secuencia de aminoácidos que altera la solubilidad, afinidad y/o la valencia de la molécula mutante de CTLA4 soluble.

15. Método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque la secuencia de aminoácidos que altera la solubilidad, afinidad y/o valencia comprende una porción de inmunoglobulina.

16. Método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la porción de inmunoglobulina es una

región constante de inmunoglobulina o porción de la misma.

17. Método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la región constante de la inmunoglobulina o una porción de la misma está mutada para reducir la función efectora.

18. Método de conformidad con la reivindicación 16, caracterizado porque la región constante de la inmunoglobulina o una porción de la misma comprende las regiones de unión, de CH2 y de CH3 de una molécula de inmunoglobulina humana o del mono.

19. Método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque la región constante de inmunoglobulina o una porción de la misma comprende las regiones de unión, de CH2 y de CH3 de una molécula de inmunoglobulina humana o del mono.

20. Método de conformidad con la reivindicación 15, caracterizado porque la inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que empieza con el ácido glutámico en la posición +152 y finaliza con la lisina en la posición +383, como se muestra en la SEC ID NO: 4.

21. Método de conformidad con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque además comprende un residuo de aminoácidos de unión y una inmunoglobulina, en donde el residuo de aminoácidos de unión está localizado entre la secuencia de aminoácidos la cual finaliza con el ácido

aspártico en la posición +150 y la inmunoglobulina.

22. Método de conformidad con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque la molécula mutante de CTLA4 es co-administrada con al menos uno de los agentes seleccionados del grupo que consiste de basiliximab, daclizumab, globulina anti-timocitos, inhibidores de calcineurina, ciclosporina, tacrolimus, micofenolato mofetilo, ácido micofenólico, rapamicina, azatioprina, muromonab, rituximab, sirolimus, everolimus, FTY720, FK778, Jak-3, centican, corticosteroides, betametasona, budesonide, cortisol, cortisona, dexametasona, hidrocritisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona y triamcinolona.

23. Método de conformidad con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque el desarrollo y/o progreso de un resultado es seleccionado del grupo que consiste de CAN, hiperlipidemia, hipertensión, diabetes, hirsutismo, alopecia, hiperplasia gingival, temblores, neurotoxicidad y la pérdida ósea es reducida.

24. Método de conformidad con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque además comprende una concentración del suero reducida, objetivo, de la molécula mutante de CTLA4 entre aproximadamente 3 µg/ml y 30 µg/ml.

25. Método para el tratamiento de un trastorno inmune asociado con el trasplante de injerto, caracterizado porque comprende la administración a un sujeto de una dosis efectiva

de una molécula mutante de CTLA4 que comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos que empieza con la metionina en la posición 27 y que finaliza con la lisina en la posición +357 ó la glicina en la posición +356 de la figura 7, o

(b) una secuencia de aminoácidos que empieza con la alanina en la posición 26 y que finaliza con la lisina en la posición +357 o la glicina en la posición +356 de la figura 7, y

en donde el régimen de administración de la molécula mutante de CTLA4 comprende un régimen de fase inicial, en donde al régimen de fase inicial puede variar desde los primeros 3 hasta 6 meses post-trasplante e involucra la administración que inicialmente es más frecuente que mensualmente.

26. Método de conformidad con las reivindicaciones 1, 2 ó 25, caracterizado porque la molécula mutante de CTLA4 es co-administrada concomitante o secuencialmente con agentes que comprenden basiliximab y MMF.

27. Método de conformidad con las reivindicaciones 1, 2 ó 25, caracterizado porque la molécula mutante de CTLA4 es co-administrada concomitante o secuencialmente con agentes que comprenden daclizumab o sirolimus.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona el uso de moléculas mutantes de CTLA4 solubles que se aglutinan con mayor afinidad hacia el antígeno de CD80 y/o CD86 que el CTLA4 del tipo silvestre o el CTLA4Ig no mutado en el tratamiento de trastornos inmunes asociados con el trasplante de injerto.

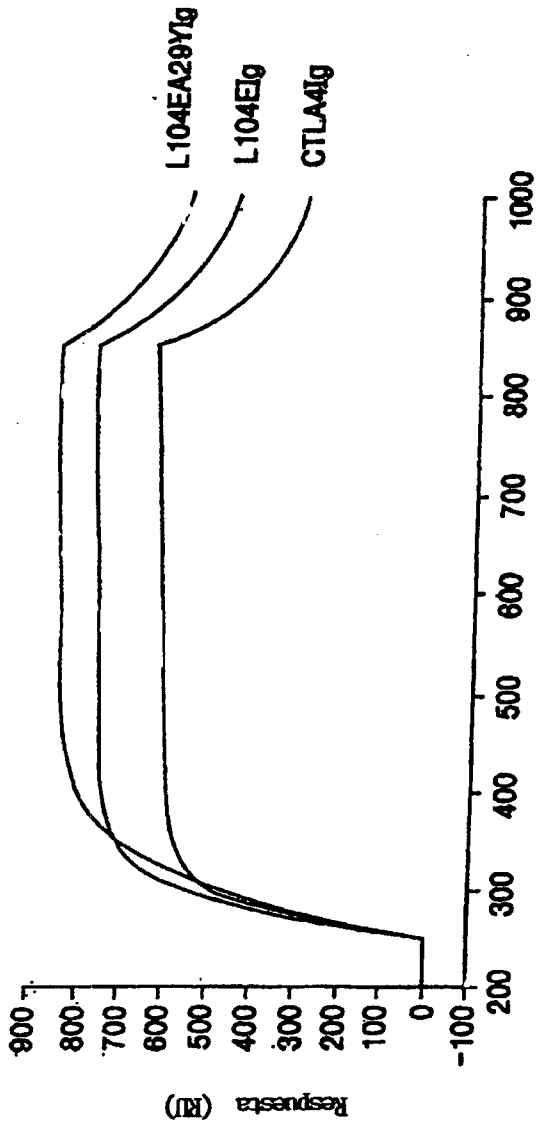

L104EA29Yig
L104EIg
CTLA4Ig
Respuesta (RU)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
Tiempo (seg.)

FIG. 1

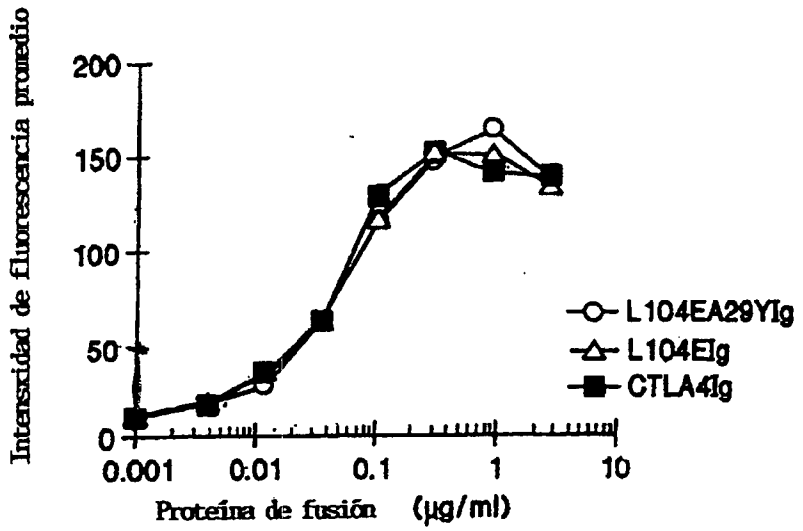

Intensidad de fluorescencia promedio
200
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Proteína de fusión (µg/ml)
L104EA29YIg
L104EIg
CTLA4Ig

FIG. 2A

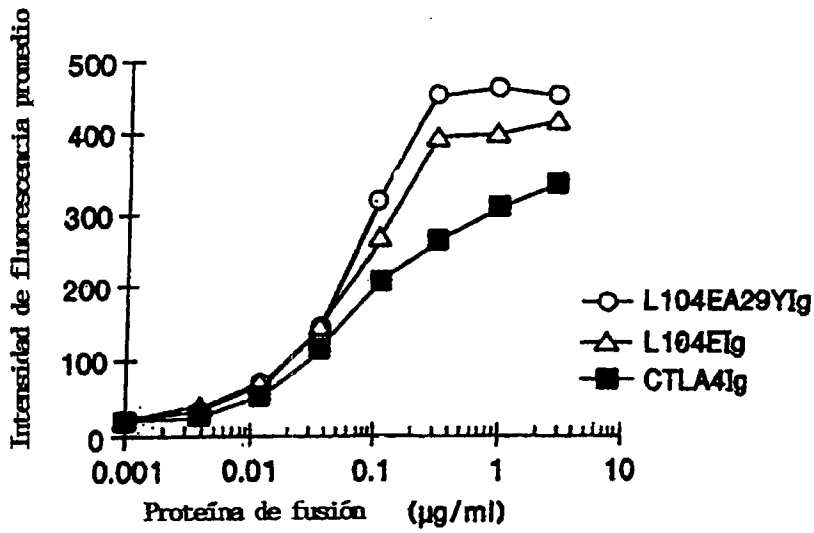

Intensidad de fluorescencia promedio
500
400
300
200
100
0
0.001
0.01
0.1
1
10
Proteína de fusión (µg/ml)
L104EA29YIg
L104EIg
CTLA4Ig

FIG. 2B

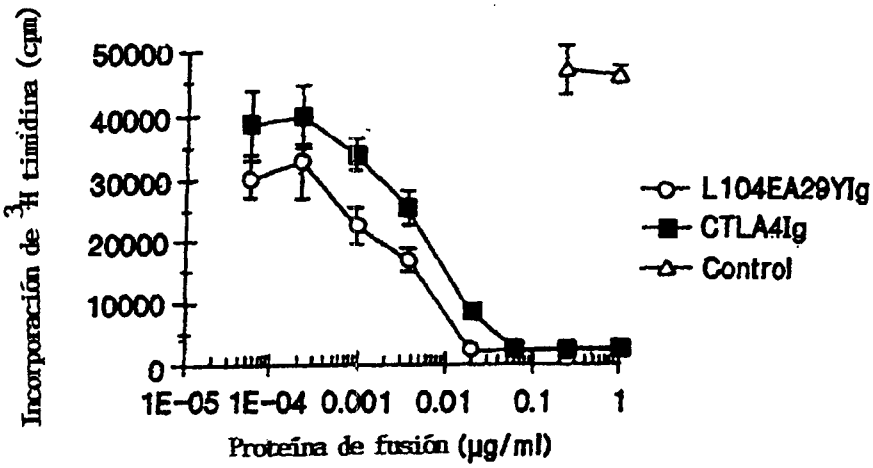

Incorporación de ^{3}H timidina (cpm)
50000
40000
30000
20000
10000
0
1E-05 1E-04 0.001 0.01 0.1 1
Proteína de fusión (µg/ml)
L104EA29YIg
CTLA4Ig
Control

FIG. 3A

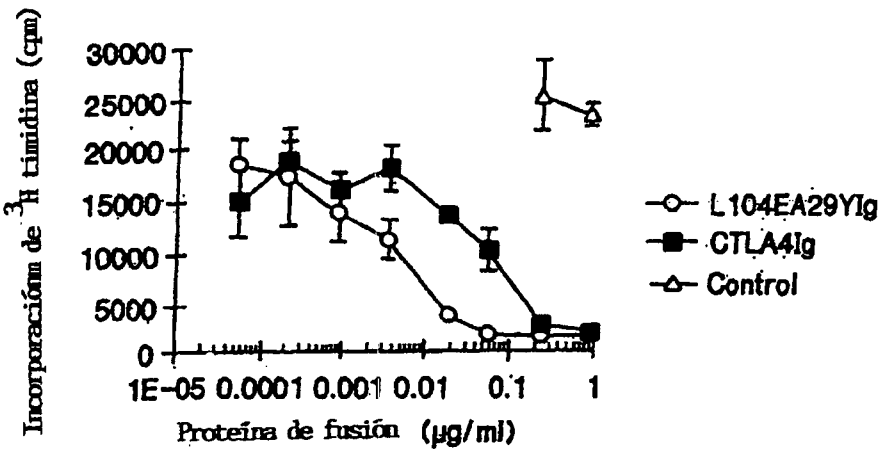

Incorporación de ^{3}H timidina (cpm)
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
1E-05 0.0001 0.001 0.01 0.1 1
Proteína de fusión (µg/ml)
L104EA29YIg
CTLA4Ig
Control

FIG. 3B

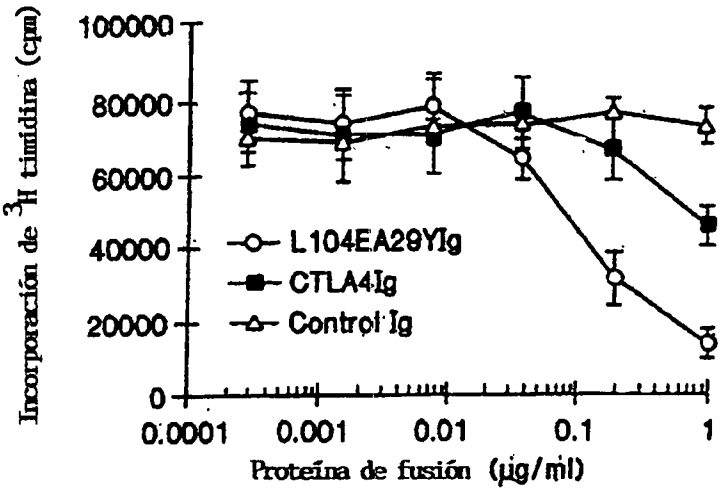

Incorporación de ^{3}H timidina (cpm)
100000
80000
60000
40000
20000
0
L104EA29YIg
CTLA4Ig
Control Ig
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
Proteína de fusión (µg/ml)

FIG. 4A

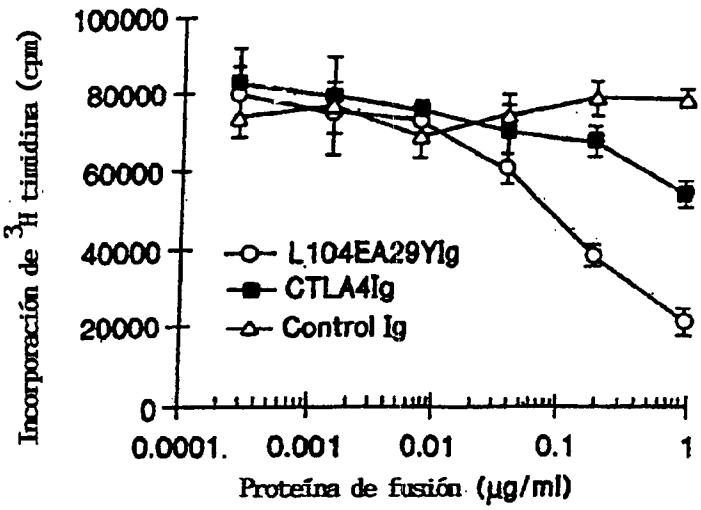

Incorporación de ^{3}H timidina (cpm)
100000
80000
60000
40000
20000
0
L104EA29YIg
CTLA4Ig
Control Ig
0.0001.
0.001
0.01
0.1
1
Proteína de fusión (µg/ml)

FIG. 4B

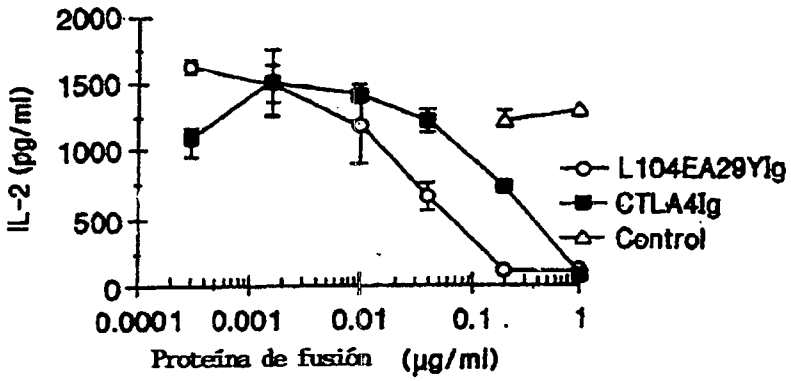


FIG. 5A

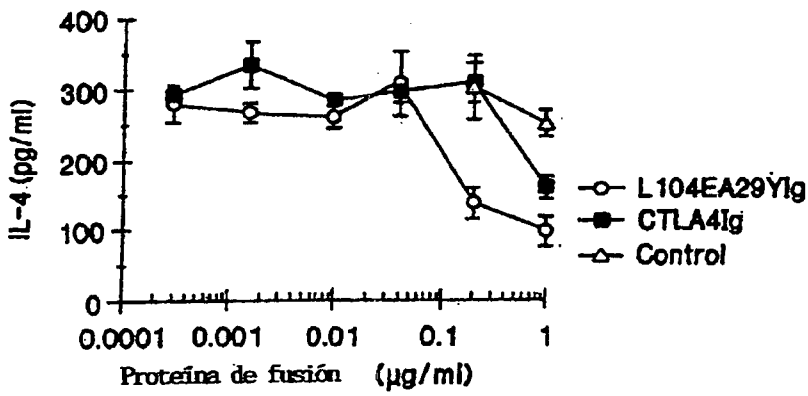


FIG. 5B

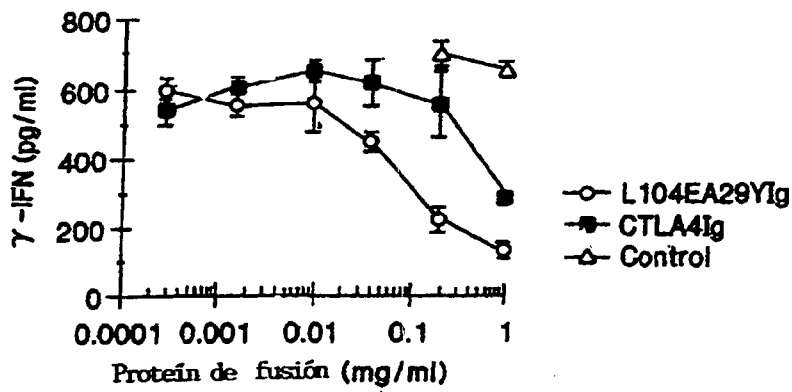


FIG. 5C

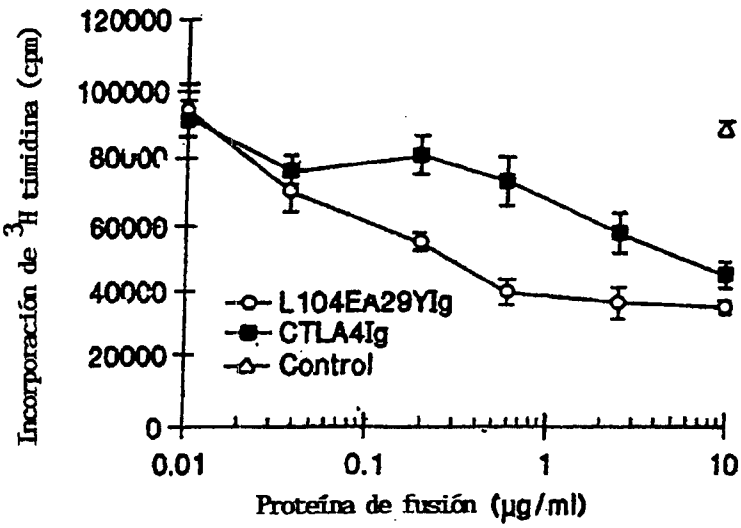

120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
0.01
0.1
1
10
Incorporación de ^{3}H timidina (cpm)
Proteína de fusión (µg/ml)
L104EA29YIg
CTLA4Ig
Control

FIG. 6

```
ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA      -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--      -7

AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA      +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--      +14
                +1

GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAATATACTGAGGTCCGGGTG      +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--Y--T--E--V--R--V--      +34

ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG      +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--      +54

GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA      +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--      +74

GTGAACCTCACTATCCAAGGAGTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG      +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--      +94

GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA      +342
E--L--M--Y--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--      +114

ATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC      +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--      +134

ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC      +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--      +154

CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG      +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--      +174

GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG      +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--      +194

CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC      +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--      +214

GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC      +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--      +234

AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA      +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--      +254

GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC      +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--      +274

CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT      +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--      +294

GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC      +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--      +314

TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA      +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--      +334

TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT      +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--      +354

CCGGGTAAATGA
P--G--K--*
```

FIG. 7

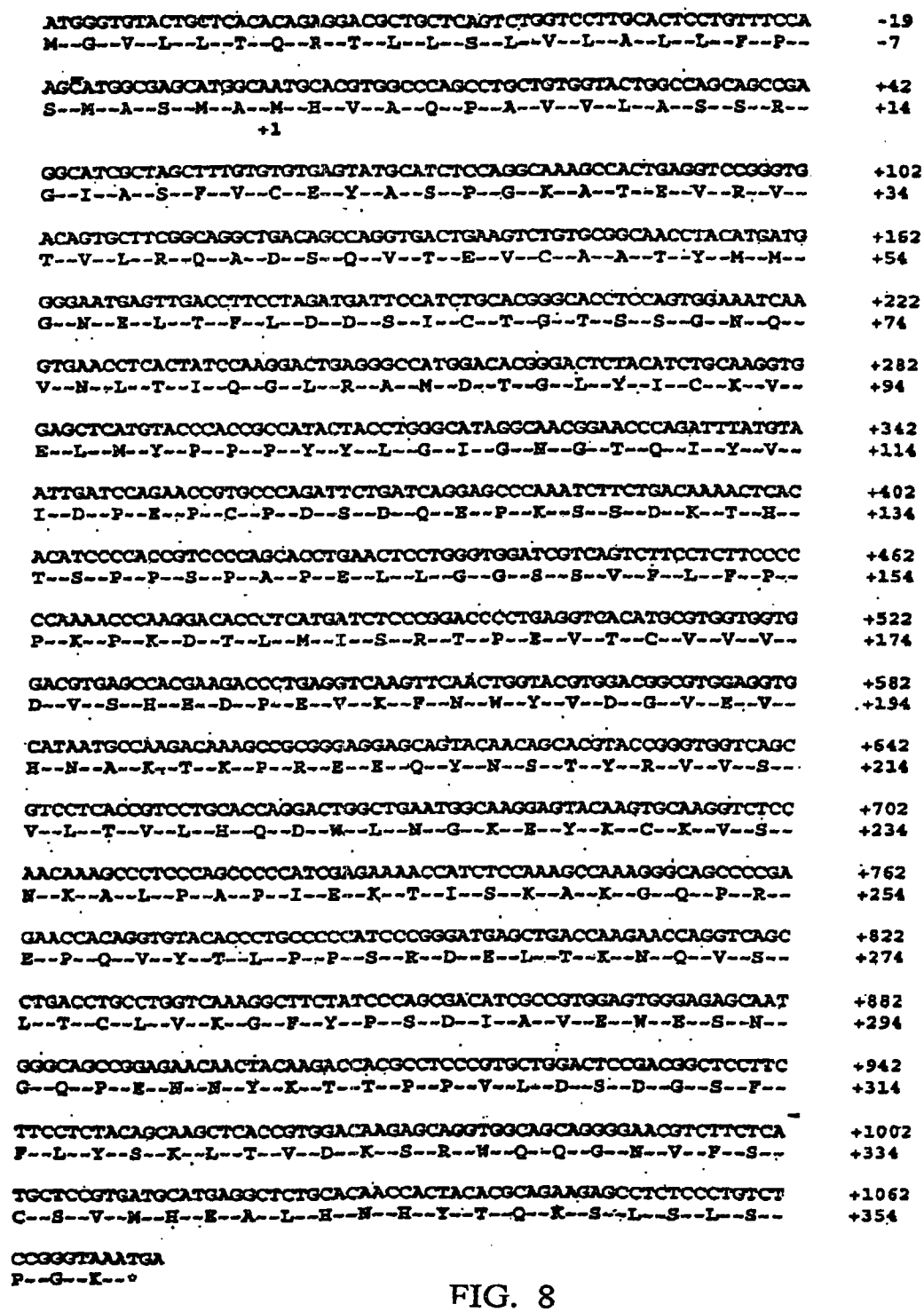

ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P-- -7
AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R-- +14
+1
GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V-- +34
ACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M-- +54
GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q-- +74
GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V-- +94
GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--L--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V-- +114
ATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H-- +134
ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGTGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P-- +154
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V-- +174
GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V-- +194
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S-- +214
GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S-- +234
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R-- +254
GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S-- +274
CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N-- +294
GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F-- +314
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S-- +334
TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S-- +354
CCGGGTAAATGA
P--G--K--*

FIG. 8

```
ATGGGTGTACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTCTGGTCCTTGCACTCCTGTTTCCA      -19
M--G--V--L--L--T--Q--R--T--L--L--S--L--V--L--A--L--L--F--P--      -7

AGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAGCCGA      +42
S--M--A--S--M--A--M--H--V--A--Q--P--A--V--V--L--A--S--S--R--      +14
          +1

GGCATCGCTAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCAAAGCCACTGAGGTCCGGGTG      +102
G--I--A--S--F--V--C--E--Y--A--S--P--G--K--A--T--E--V--R--V--      +34

ACAGTGCTTGGGCAGGCTGACAGCCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATG      +162
T--V--L--R--Q--A--D--S--Q--V--T--E--V--C--A--A--T--Y--M--M--      +54

GGGAATGAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGCACCTCCAGTGGAAATCAA      +222
G--N--E--L--T--F--L--D--D--S--I--C--T--G--T--S--S--G--N--Q--      +74

GTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGGACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTG      +282
V--N--L--T--I--Q--G--L--R--A--M--D--T--G--L--Y--I--C--K--V--      +94

GAGCTCATGTACCCACCGCCATACTACGAGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTA      +342
E--L--M--Y--P--P--P--Y--Y--E--G--I--G--N--G--T--Q--I--Y--V--      +114

ATTGATCCAGAACCGTGCCCAGATTCTGATCAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACTCAC      +402
I--D--P--E--P--C--P--D--S--D--Q--E--P--K--S--S--D--K--T--H--      +134

ACATCCCCACCGTCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC      +462
T--S--P--P--S--P--A--P--E--L--L--G--G--S--S--V--F--L--F--P--      +154

CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG      +522
P--K--P--K--D--T--L--M--I--S--R--T--P--E--V--T--C--V--V--V--      +174

GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG      +582
D--V--S--H--E--D--P--E--V--K--F--N--W--Y--V--D--G--V--E--V--      +194

CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC      +642
H--N--A--K--T--K--P--R--E--E--Q--Y--N--S--T--Y--R--V--V--S--      +214

GTCGTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC      +702
V--L--T--V--L--H--Q--D--W--L--N--G--K--E--Y--K--C--K--V--S--      +234

AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA      +762
N--K--A--L--P--A--P--I--E--K--T--I--S--K--A--K--G--Q--P--R--      +254

GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC      +822
E--P--Q--V--Y--T--L--P--P--S--R--D--E--L--T--K--N--Q--V--S--      +274

CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT      +882
L--T--C--L--V--K--G--F--Y--P--S--D--I--A--V--E--W--E--S--N--      +294

GGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC      +942
G--Q--P--E--N--N--Y--K--T--T--P--P--V--L--D--S--D--G--S--F--      +314

TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA      +1002
F--L--Y--S--K--L--T--V--D--K--S--R--W--Q--Q--G--N--V--F--S--      +334

TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT      +1062
C--S--V--M--H--E--A--L--H--N--H--Y--T--Q--K--S--L--S--L--S--      +354

CCGGGTAAATGA
P--G--K--*
```

FIG. 9

FIG. 10A

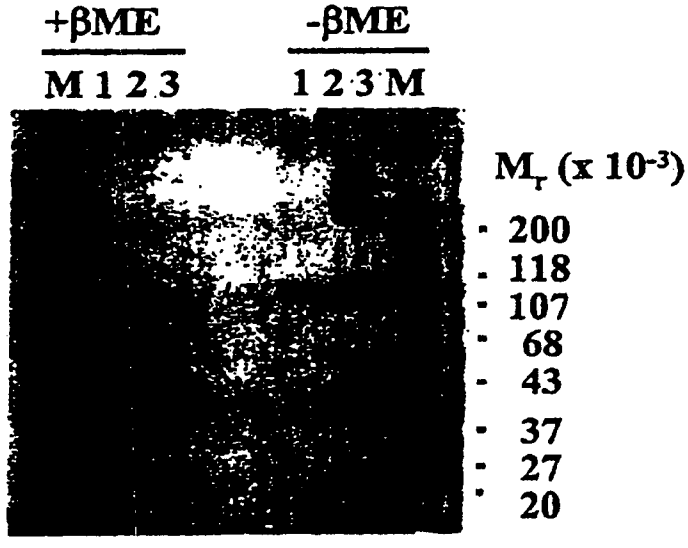


FIG. 10B

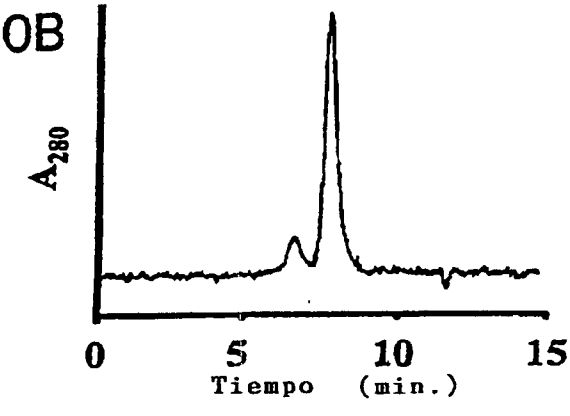
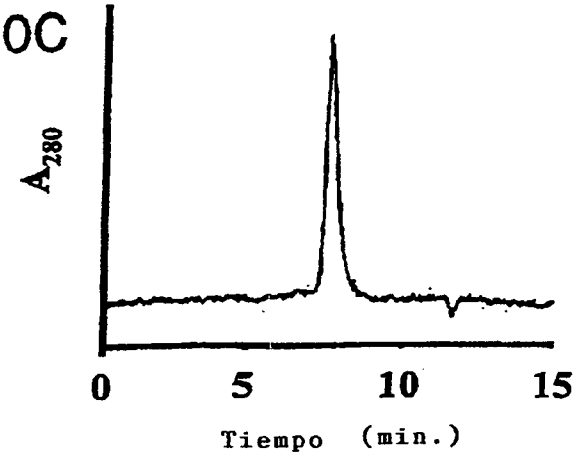


FIG. 10C



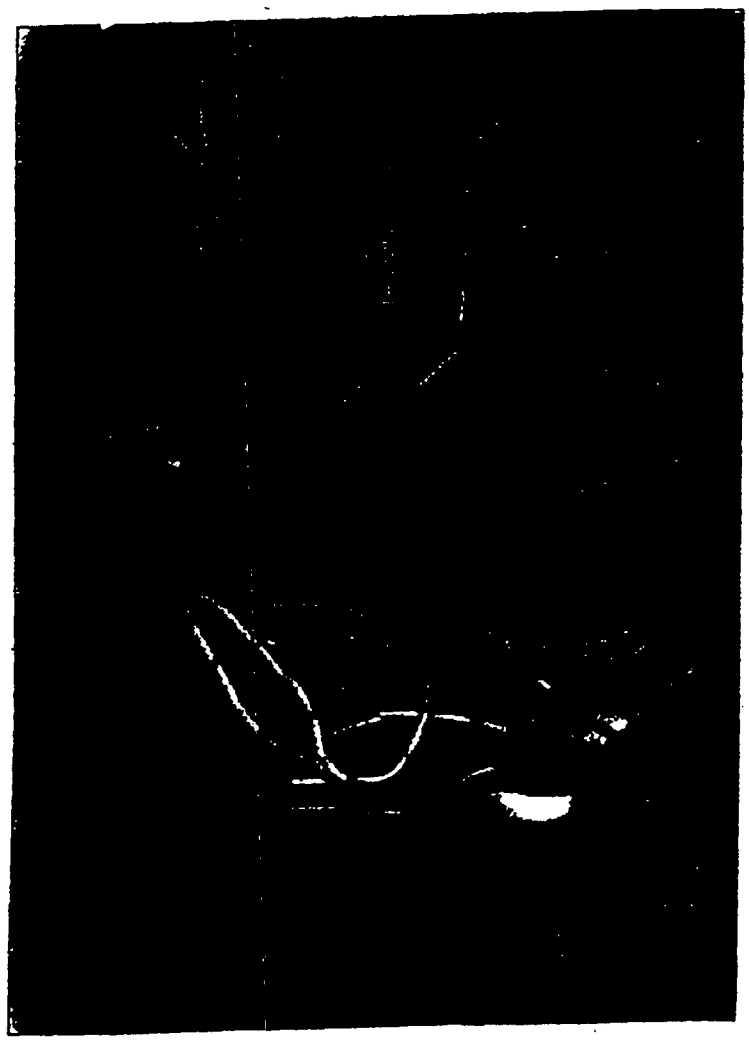


FIG. 11

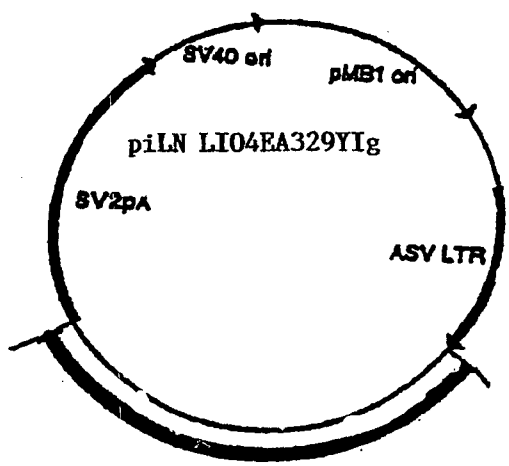


FIG. 12

PEPTIDO DE LA SEÑAL M DE ONCOSTATINA

```
M  G  V  L  L  T  Q  R  T  L  L  S  L  V  L
ATG GGT GTA CTG CTC ACA CAG AGG ACG CTG CTC AGT CTG GTC CTT   45

                          -1 +1
A  L  L  F  P  S  M  A  S  M  A  M  H  V  A
GCA CTC CTG TTT CCA AGC ATG GCG AGC ATG GCA ATG CAC GTG GCC   90

Q  P  A  V  V  L  A  S  S  R  G  I  A  S  F
CAG CCT GCT GTG GTA CTG GCC AGC AGC CGA GGC ATC GCC AGC TTT  135

V  C  E  Y  A  S  P  G  K  A  T  E  V  R  V
GTG TGT GAG TAT GCA TCT CCA GGC AAA GCC ACT GAG GTC CGG GTG  180

T  V  L  R  Q  A  D  S  Q  V  T  E  V  C  A
ACA GTG CTT CGG CAG GCT GAC AGC CAG GTG ACT GAA GTC TGT GCG  225

A  T  Y  M  M  G  N  E  L  T  F  L  D  D  S
GCA ACC TAC ATG ATG GGG AAT GAG TTG ACC TTC CTA GAT GAT TCC  270

I  C  T  G  T  S  S  G  N  Q  V  N  L  T  I
ATC TGC ACG GGC ACC TCC AGT GGA AAT CAA GTG AAC CTC ACT ATC  315

Q  G  L  R  A  M  D  T  G  L  Y  I  C  K  V
CAA GGA CTG AGG GCC ATG GAC ACG GGA CTC TAC ATC TGC AAG GTG  360
                                   SITIO DE GLICOSILACION
E  L  M  Y  P  P  P  Y  Y  L  G  I  G  N  G
GAG CTC ATG TAC CCA CCG CCA TAC TAC CTG GGC ATA GGC AAC GGA  405

T  Q  I  Y  V  I  D  P  E  P  C  P  D  S  D
ACC CAG ATT TAT GTA ATT GAT CCA GAA CCG TGC CCA GAT TCT GAC  450

F  L  L  W  I  L  A  A  V  S  S  G  L  F  F
TTC CTC CTC TGG ATC CTT GCA GCA GTT AGT TCG GGG TTG TTT TTT  495

Y  S  F  L  L  T  A  V  S  L  S  K  M  L  K
TAT AGC TTT CTC CTC ACA GCT GTT TCT TTG AGC AAA ATG CTA AAG  540

K  R  S  P  L  T  T  G  V  Y  V  K  M  P  P
AAA AGA AGC CCT CTT ACA ACA GGG GTC TAT GTG AAA ATG CCC CCA  585

T  E  P  E  C  E  K  Q  F  Q  P  Y  F  I  P
ACA GAG CCA GAA TGT GAA AAG CAA TTT CAG CCT TAT TTT ATT CCC  630

I  N
ATC AAT                                                     636
```

FIG. 13

147

00232

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bristol-Myers Squibb Company
Hagerty, David
Rusnak, James

<120> METODOS PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS INMUNES ASOCIADOS CON EL TRASPLANTE DE INJERTO CON MOLÉCULAS MUTANTES DE CTLA4 SOLUBLES

<130> 10522 PSP

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador Delantero de CTLA4 de Oncostatina M (OMCTLA4)

<400> 1
gaggtgataa agcttcacca atgggtgtac tgctcacaca g 41

<210> 2
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador Inverso de CTLA4 de Oncostatina M (OMCTLA4)

<400> 2
gtggtgtatt ggtctagatc aatcagaatc tgggcacggt tc 42

<210> 3
<211> 1152
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> L104EA29YIg

<400> 3
atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcact cctgtttcca 60

agcatggcga gcatggcaat gcacgtgggc cagcctgctg tggtactggc cagcagccga 120

ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aatatactga ggtccgggtg 180

acagtgcttc ggcaggctga cagccaggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240

gggaatgagt tgaccttcct agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300

gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacaggg gactctacat ctgcaaggtg 360

gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaaccca gatttatgta 420

attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480

acatccccac cgtcccccagc acctgaactc ctgggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 540

ccaaaacccа aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140

ccgggtaaat ga 1152

<210> 4
<211> 383
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> L104EA29YIg

<400> 4

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 5
<211> 1152
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> L104EIg

<400> 5
atgggtgtac tgctcacaca gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcact cctgtttcca 60

agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggtactggc cagcagccga 120

ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg 180

acagtgcttc ggcaggctga cagccaggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240

gggaatgagt tgaccttcct agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300

gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaaggtg 360

gagctcatgt acccaccgcc atactacgag ggcataggca acggaaccca gatttatgta 420

attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagcccc aatcttctga caaaactcac 480

acatccccac cgtccccagc acctgaactc ctgggggggat cgtcagtctt cctcttcccc 540

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 720

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140

ccgggtaaat ga 1152

<210> 6
<211> 383
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> L104EIg

<400> 6

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 7
<211> 1152
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CTLA4Ig

<400> 7

atgggtgtac tgctcacacc gaggacgctg ctcagtctgg tccttgcact cctgtttcca 60

agcatggcga gcatggcaat gcacgtggcc cagcctgctg tggtactggc cagcagccga 120

ggcatcgcta gctttgtgtg tgagtatgca tctccaggca aagccactga ggtccgggtg 180

acagtgcttc ggcaggctga cagccaggtg actgaagtct gtgcggcaac ctacatgatg 240

gggaatgagt tgaccttcct agatgattcc atctgcacgg gcacctccag tggaaatcaa 300

gtgaacctca ctatccaagg actgagggcc atggacacgg gactctacat ctgcaaggtg 360

gagctcatgt acccaccgcc atactacctg ggcataggca acggaaccca gatttatgta 420

attgatccag aaccgtgccc agattctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 480

acatcccccc cgtcccccgc acctgaactc ctgggtggat cgtcagtctt cctcttcccc 540

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 600

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 660

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg ggtggtcagc 720

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 780

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 840

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 900

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 960

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1020

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1080

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1140

ccgggtaaat ga 1152

<210> 8
<211> 383
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> CTLA4Ig

<400> 8

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
20 25 30

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
35 40 45

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
50 55 60

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
65 70 75 80

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
85 90 95

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
115 120 125

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
130 135 140

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
145 150 155 160

Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val
165 170 175

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

180 185 190

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
195 200 205

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
210 215 220

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
225 230 235 240

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
245 250 255

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
260 265 270

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
275 280 285

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
290 295 300

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
305 310 315 320

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
325 330 335

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
340 345 350

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
355 360 365

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375 380

<210> 9
<211> 636
<212> ADN
<213> Homo Sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(636)

<220>
<221> mat_péptido
<222> (79)..()

<400> 9

```
atg ggt gta ctg ctc aca cag agg acg ctg ctc agt ctg gtc ctt gca      48
Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
    -25                 -20                 -15

ctc ctg ttt cca agc atg gcg agc atg gca atg cac gtg gcc cag cct      96
Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10                 -5                  -1  1                   5

gct gtg gta ctg gcc agc agc cga ggc atc gcc agc ttt gtg tgt gag     144
Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
            10                  15                  20

tat gca tct cca ggc aaa gcc act gag gtc cgg gtg aca gtg ctt cgg     192
Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
        25                  30                  35

cag gct gac agc cag gtg act gaa gtc tgt gcg gca acc tac atg atg     240
Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
    40                  45                  50

ggg aat gag ttg acc ttc cta gat gat tcc atc tgc acg ggc acc tcc     288
Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55                  60                  65                  70

agt gga aat caa gtg aac ctc act atc caa gga ctg agg gcc atg gac     336
Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
                75                  80                  85

acg gga ctc tac atc tgc aag gtg gag ctc atg tac cca ccg cca tac     384
Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
            90                  95                  100

tac ctg ggc ata ggc aac gga acc cag att tat gta att gat cca gaa     432
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
        105                 110                 115

ccg tgc cca gat tct gac ttc ctc ctc tgg atc ctt gca gca gtt agt     480
Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
    120                 125                 130

tcg ggg ttg ttt ttt tat agc ttt ctc ctc aca gct gtt tct ttg agc     528
Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
135                 140                 145                 150

aaa atg cta aag aaa aga agc cct ctt aca aca ggg gtc tat gtg aaa     576
Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
                155                 160                 165
```

atg ccc cca aca gag cca gaa tgt gaa aag caa ttt cag cct tat ttt 624
Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
170 175 180

att ccc atc aat 636
Ile Pro Ile Asn
185

<210> 10
<211> 212
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 10

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
-25 -20 -15

Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
-10 -5 -1 1 5

Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
10 15 20

Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
25 30 35

Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
40 45 50

Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
55 60 65 70

Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
75 80 85

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
90 95 100

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
105 110 115

Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
120 125 130

Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser

135 140 145 150

Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys
155 160 165

Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
170 175 180

Ile Pro Ile Asn
185

00244

SOLICITUD PCT

Original (para PRESENTACIÓN)

VIII-2-1	Declaración: Derecho a solicitar y otorgársele una patente Declaración en cuanto al derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, a solicitar y otorgársele una patente(Reglas 4.17(ii) y 51bis.1(a)(ii)), en el caso cuando la declaración conforme a la Regla 4.17 (iv) no sea apropiada Nombre (ÚLTIMO, Primero)	En relación con esta solicitud internacional BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY tiene derecho a solicitar y otorgársele una patente por virtud de lo siguiente:
VIII-2-1 (iv)		Un traspaso de HAGERTY, David a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechado el 15 de Junio de 2005 (15.06.2005)
VIII-2-1 (iv)		Un traspaso de RUSNAK, James a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechado el 03 de Mayo de 2005 (03.05.2005)
VIII-2-1 (ix)	Esta declaración se hace para los propósitos de	todas las designaciones excepto la designación de los Estados Unidos de América

SOLICITUD PCT

Original (para PRESENTACIÓN)

VIII-3-1	Declaración: Derecho a reivindicar prioridad Declaración en cuanto al derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior especificada adelante, en donde el solicitante no es el solicitante que presenta la solicitud anterior o cuando el nombre del solicitante ha cambiado en razón a la presentación de la solicitud anterior (Reglas 4.17(iii) y 51bis.1(a)(iii)), Nombre	En relación con esta solicitud internacional BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY tiene derecho a reivindicar prioridad de la solicitud anterior No. 60/688, 774 por virtud de lo siguiente:
VIII-3-1(iv)		Un traspaso de HAGERTY, David a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechado el 15 de Junio de 2005 (15.06.2005)
VIII-3-1(iv)		Un traspaso de RUSNAK, James a BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY, fechado el 03 de Mayo de 2005 (03.05.2005)
VIII-3-1(ix)	Esta declaración se hace para los propósitos de	AP: (BW GH GM KE LS MW MZ NA SD SL SZ TZ UG ZM ZW); EA: (AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM); EP: (AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IS IT LT LU LV MC NL PL PT RO SE SI SK TR); OA: (BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG); AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BW BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE EG ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KM KN KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV LY MA MD MG MK MN MW MX MZ NA NG NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SM SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG UZ VC VN YU ZA ZM ZW

10522A-WO PCT
Parlet

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2006/012648

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

PARLET, Nickki
Bristol-Myers Squibb Company
P.O. Box 4000
Princeton, New Jersey 08543-4000
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day month year)* 04 July 2006 (04.07.2006)	
Applicant's or agent's file reference 10522A PCT	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/US2006/012648	International filing date *(day month year)* 05 April 2006 (05.04.2006)
International publication date *(day month year)* **Not yet published**	Priority date *(day month year)* 06 April 2005 (06.04.2005)

Applicant

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY et al

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).

2. *(If applicable)* The **letters "NR"** appearing in the right-hand column denote **a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau** under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

3. *(If applicable)***An asterisk (*)** appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes **a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b)** (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
06 April 2005 (06.04.2005) ✓	60/668,774 ✓	US	19 June 2006 (19.06.2006)

RECEIVED
BMS PATENT LAW
JUL 21 2006
Docketed Item
Due Date
Attorney

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer

Piozin Thierry

~~Facsimile No.~~ +41 22 338 90 90
Telephone No. +41 22 338 84 47

21

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

00247

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
10522A PCT		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2006/012648	05/04/2006	06/04/2005
Applicant		
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [X] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1
      [ ] as suggested by the applicant
      [X] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/012648

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [X] contained in the international application as filed

   [X] filed together with the international application in electronic form

   [ ] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

213

International application No PCT/US2006/012648

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, PAJ, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/088991 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY; COHEN, ROBERT; CARR, SUZETTE; HAGERTY, D) 30 October 2003 (2003-10-30) the whole document	1-27
X	LARSEN C P ET AL: "Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties" AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION 2005 DENMARK, vol. 5, no. 3, March 2005 (2005-03), pages 443-453, XP002393471 ISSN: 1600-6135 cited in the application the whole document	1-27

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 August 2006	22/08/2006

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Valcarcel, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

International application No
PCT/US2006/012648

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ADAMS A B ET AL: "CALCINEURIN INHIBITOR-FREE CD28 BLOCKADE-BASED PROTOCOL PROTECTS ALLOGENEIC ISLETS IN NONHUMAN PRIMATES" DIABETES, NEW YORK, NY, US, vol. 51, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 265-270, XP008054843 ISSN: 0012-1797 cited in the application the whole document	1-27
X	ADAMS ANDREW B ET AL: "Development of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody that synergizes with LEA29Y to prolong islet allograft survival" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 174, no. 1, 1 January 2005 (2005-01-01), pages 542-550, XP002393472 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-27
X	WO 02/094202 A (EMORY UNIVERSITY; LARSEN, CHRISTIAN, P; PEARSON, THOMAS, C; ADAMS, AND) 28 November 2002 (2002-11-28) the whole document	1-27
P,X	VINCENTI FLAVIO ET AL: "Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation." THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. 25 AUG 2005, vol. 353, no. 8, 25 August 2005 (2005-08-25), pages 770-781, XP009070530 ISSN: 1533-4406 the whole document	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/012648

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 1-27 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/US2006/012648

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03088991 A	30-10-2003	AU 2003243152 A1	03-11-2003
		CA 2482042 A1	30-10-2003
		EP 1496931 A1	19-01-2005
WO 02094202 A	28-11-2002	CA 2447921 A1	28-11-2002
		CZ 20033188 A3	13-04-2005
		EP 1397153 A2	17-03-2004
		HU 0401590 A2	29-11-2004
		JP 2004535402 T	25-11-2004
		MX PA03010568 A	07-03-2005
		NO 20035176 A	05-01-2004
		PL 364578 A1	13-12-2004

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	see form PCT/ISA/210 (second sheet)
Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below
see form PCT/ISA/220	

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2006/012648	05.04.2006	06.04.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K38/17

Applicant
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	see form PCT/ISA/210	Valcarcel, R Telephone No. +49 89 2399-2368

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2006/012648

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

      ☒ a sequence listing

      ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

      ☒ on paper

      ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing:

      ☒ contained in the international application as filed.

      ☒ filed together with the international application in electronic form.

      ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis*.1 and 64.1) is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2006/012648

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 1-27 (with respect to industrial applicability)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-27 (with respect to industrial applicability) relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☒ See Supplemental Box for further details

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2006/012648

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	NONE
	No:	Claims	1-27
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	NONE
	No:	Claims	1-27
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	NONE
	No:	Claims	NONE

2. Citations and explanations

see separate sheet

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (SEPARATE SHEET)

International application No.

PCT/US2006/012648

Re Item III.

Claims 1-27 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V.

1 The document numbering corresponds to the order of citation in the international search report.

Lack of clarity

2. The present application does not meet the requirements of Article 6 PCT since the below referred terminology used in the claims is unclear.

2.1 It is unclear what is meant by the expressions "week n visit" and "target trough serum". Thus, all claims referring to said terms are unclear. It is noted that the meaning of the claims should be clear from the wording of the claims alone.

2.2 Claim 25 refers to methionine at position 27 (which appears to correspond to position +1 of Figure 7 of the present application) and ending at +357 or +356 of figure 7. Thus, claim 25 refers to two different numberings: the first one, starting at the first N-terminal methionine of Figure 7 (position -26 according to the numbering at the right margin of figure 7); and the second numbering according to the right margin of figure 7.

2.3 It is noted that the mutant defined in claim 1 of the present application, has been disclosed in the prior art with varied nomenclature. Figure 7 of the PA corresponds to a CTLA mutant having the two mutations A55A and L130E, thus, also corresponding to the CTLA4 mutant named LEA29Y (or belatacept) in prior art documents. Said mutant is also named L104EA29YIg (SEQ ID NO: 4) in the present application.

Lack of novelty

3. The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because **the subject-matter of claims 1-27 is not new** in the sense of Article 33(2) PCT.

3.1 Figure 19 of D1 discloses a CTLA4 soluble mutant having the following mutations A55Y and L130E (position 55 corresponds to position +29 according to the numbering of figure 19 and position 130 corresponds to position +104 according to the numbering of figure 19). It is noted that figure 19 of D1 is identical to figure 7 of the present application. Said mutant is named L104EA29YIg, being a synonym of LEA29Y and LEA (see example 3 on page 95).

Furthermore, claims 51, 53 and 54 of D1 disclose methods for treating an immune disorder associated with graft transplantation comprising administering to a subject an effective dose of a CTLA4 mutant L104EA29YIg having the sequence shown in Figure 19 (SEQ ID NO: 9) beginning with methionine at position +1 or with alanine at position -1 and ending with lysine at position +357. Claim 52 discloses a method as just described but wherein CTL4 mutant comprises a fragment of the polypeptide of figure 19 beginning with methionine at position +1 or with alanine at position -1 and ending with aspartic acid at position +124 .

Moreover, on page 37 (lines 5-9) and page 69 (lines 4-12) a definition is given for an effective amount of the CTLA4 mutants to be used, and it is disclosed that it may be administered daily, weekly, monthly and/or yearly, in single or multiple times per hour/day/week/month/year depending on need. For example, in one embodiment, the molecule may initially be administered once every two weeks for a month, and then once every month thereafter. Said administration regimen falls under the scope of claims 1-6 of the present application. The amounts recited in claims 51-54 of D1 also fall under the scope of claims 7 and 8 of the present application. Also the regimens referred to in claims 9-11 of the present application appear to coincide with the regimen disclosed in page 69 of D1.

D1 further discloses immune disorders associated with graft transplantation rejection comprising solid organ, tissue and/or cell transplant rejection, (as kidney transplant rejection), see page 31 lines 11-16.

D1 also discloses the fusion of the L104EA29Y to an immunoglobulin moiety (see e.g. claim 51, wherein L104EA29YIg is used in the methods of treatment). On claim 52 of D1 a fragment comprising up to aspartic acid at position +124 is fused to Ig. This appears

to be the same aspartic acid as referred in claim 21 of the present application as being position 150.
D1 also discloses the combined administration of the CTL4 mutants with other compounds such as non inflammatory steroid drugs, corticosteroids, etc (see e.g. pages 52, 61, 70 or 105), in particular basiliximab (see page 70, line 5).

Since the use of CTLA4 mutants aids in the prevention of renal or islet transplantation rejection a reduced progression of diabetes, or hypertension is disclosed (as referred to in claim 23 of the present application).

Thus, **D1 is prejudicial to the novelty of claims 1-23, 25 and 26 of the present application.**

3.2 D2 discloses the use of LEA29Y (belatacept) in methods of treating an immune disorder associated with graft transplantation (renal allograft, see abstract). LEA29Y was administered intra-operatively (10 mg/kg IV), on day 4 (15 mg/kg) and on post-operative days 14,28, 42, 56 and 70 (20 mg/kg IV), see page 445 left column, towards the middle of the first paragraph). Furthermore, the mutant molecule was co-administered with other agents as methylprednisolone (d0: 20 mg, d4, 4 mg) and basiliximab (0,3 mg/kg at d0 and d4), see page 445, left column, towards the end of first paragraph). Thus, D2 is prejudicial to at least the novelty of claims 1-3, 7, 22 and 25 of the present application.

3.3 D3 discloses the use of the LEA29Y mutant in methods to induce immunosuppression to be used in islet transplantation to treat diabetes. LEA29Y was administered intravenously intra-operatively (10 mg/kg) and on postoperative day (POD) 4 (15 mg/kg). Additional doses of 20 mg/kg were given on POD 14 and every 2 weeks until POD 154. Thus, D3 is also prejudicial to the novelty of claims 1- 3 and 25 of the present application.

3.4 D4 discloses the use of the LEA29Y to induce immunosuppression in primate islet transplantation. LEA29Y was administered intraoperatively (20 mg/kg); on postoperative days 4, 7, and 14, then every 2 weeks until day 100. Additional doses (20 mg/kg) were administered monthly through 6 months (see page 544, left column, first paragraph). Thus, D4 is also prejudicial to the novelty of claims 1- 3 and 25 of the present

application.

3.5 D5 discloses methods for inhibiting islet cell transplant rejection in a subject comprising the use of CTLA4 mutants, such as L104EA29YIg (see claim 2). The administration regime exemplified for L104EA29YIg in page 65 (lines 24-27) appears to fall under the scope of claims 1-8 of the present application.

The serum trough level concentration in said example is said to be greater than 30 µg/ml. Since claim 24 of the present application refers to "about" 30 µg/ml (said "about" being an imprecise term), the serum through level is considered to fall under the scope of claim 24 of the present application.

D5 further discloses the simultaneous administration of the CTLA4 mutants with other drugs such as basiliximab (see page 42, lines 19 and 20), or siroliums (see page 65, line 19).

One of the effects of the methods disclosed in D5 reduces the development of diabetes (see page 67, lines 15-28).

Thus, D5 is prejudicial to the novelty of claims 1-8, 12-19 and 22-27 of the present application.

Lack of inventive step

4. The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-27 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

As discussed in the previous sections, claims 1-27 are not novel. Furthermore, it is noted that the recitation of particular administration regimen could be only considered inventive in case an unexpected effect would be associated to said particular regimen. The skilled person in view of D1 or D5 would have been able to use the recited administration regimen but also to adapt said regimen to the need of the particular patient (see e.g. page 39 of D5). Thus, in the absence of an unexpected effect of a given administration

regimen, said regimen would be considered as a mere obvious alternative to known regimens.

Even further, if a particular regimen showed an unexpected effect for a particular therapeutical application, only claims restricted to said particular application could be considered inventive. Said particular effect is likely not to be applicable to any possible application. If an effect is not expressed in a claim but is part of the problem to be solved, and the claim comprises non working-embodiments, there is a problem of inventive step.

The same reasoning applies to combinations of known drugs. It appears at present that particular combinations of known drugs could not be considered inventive since the recited compounds are well known compounds which are standardly used. The skilled person, depending on the circumstances would be able to use said combination without the involvement of inventive skill, especially as the advantages thus achieved can readily be foreseen (as for example using combinations of compounds commonly used in transplantations as immunosuppressants).

Methods of treatment

5. For the assessment of the present claims 1-27 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

PCT

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Referencia de archivo del solicitante o agente Caso 10522A PCT	**PARA ACCION ADICIONAL** Ver la Forma PCT/ISA/220	
Solicitud internacional No. PCT/US2006/012648	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 05/04/2006	Fecha de prioridad (día/mes/año) 06/04/2005
Solicitante BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY		

Este reporte es el reporte de búsqueda internacional, establecido por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y se transmite al solicitante de acuerdo al Artículo 18. Una copia del mismo ha sido transmitida a la Oficina Internacional

Este REPORTE consiste de un total de 6 , hojas

☒ También ha sido acompañado por una copia de cada documento del arte previo citado en este reporte

1. Bases del Reporte
   a. Con respecto al lenguaje, la búsqueda internacional ha sido llevada a cabo sobre la base de
      ☒ La solicitud internacional en el lenguaje en el cuál fue presentado.
      ☐ La búsqueda Internacional ha sido llevada a cabo en base a la traducción de la solicitud internacional presentada a esta Autoridad (Regla 23.1(b)).
   b. ☒ Con respecto a cualquier secuencia de nucleotidos y aminoácidos descrita en la Solicitud Internacional, ver recuadro I.

2. ☒ Ciertas reivindicaciones fueron encontradas como no sometidas a una búsqueda (Ver recuadro II).

3 ☐ Carecen de unidad de invención

4 Con respecto al titulo,
   ☒ el texto es aprobado como fue presentado por el solicitante
   ☐ el texto ha sido establecido por esta Autoridad para leerse como sigue:

5. Con respecto al resumen
   ☒ el texto es aprobado como fue presentado por el solicitante
   ☐ el texto ha sido establecido de acuerdo a la Regla 38.2(B), por esta autoridad como aparece en el recuadro IV. El solicitante puede, dentro de un mes de la fecha de envío de este reporte, presentar sus comentarios a esta Autoridad.

6. Con respecto a los dibujos
   a. La figura de los dibujos ha ser publicada con el resumen es la Figura No._____
      ☐ como se sugirió por el solicitante
      ☒ como se selecciono por esta Autoridad, debido a que el solicitante fallo al sugerir una figura.
      ☐ como se selecciono por esta Autoridad, debido a que esta figura caracteriza mejor la invención.
   b. ☐ ninguna de estas figuras es publicada con el resumen

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/US2006/012648

Cuadro I Nucleótidos y/o secuencia(s) de aminoácidos (Continuación del cuadro 1.b de la primera hoja)

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótido y/o aminoácido descrita en solicitud internacional y necesariamente a la invención reivindicada, esta opinión está establecida en bases de:

   a. tipo de material
      ☐ enlistado de secuencias
      ☐ tabla(s) relacionada al listado de secuencias

   b. formato del material:
      ☐ en formato escrito
      ☐ en forma leíble en computadora

   c. tiempo de presentación/proporción:
      ☐ contenida en la solicitud internacional como se presentó.
      ☐ presentado junto con la solicitud internacional en forma leíble en computadora.
      ☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad para pospropósitos de búsqueda.

2. ☐ Además, en el caso que más de una versión o copia de un listado de secuencias y/o tabla que se relaciona al mismo, se haya presentado o proporcionado, las declaraciones requeridas que la información en las copias subsecuentes o adicionales es idéntica a ésta en la solicitud como se presentó o no va más allá de la solicitud como se presentó, como apropiadamente, fue proporcionada.

3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional PCT/US2006/012648

A. CLASIFICACION DEL TEMA

INV. A61K38/17

De acuerdo a la Clasificación de Patentes Internacional (IPC) o a la clasificación nacional y a la IPC.

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por los símbolos de clasificación):
A61K

Documentación buscada diferente a la documentación mínima, a la extensión que tales documentos están incluidos en los campos buscados:

Base de datos electrónicos consultados durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, en donde sea práctico, términos de búsqueda utilizados):
EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, PAJ, Sequence Search

C. DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
X	WO 03/088991 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY; COHEN, ROBERT; CARR, SUZETTE; HAGERTY, D) 30 Octubre 2003 (2003-10-30) en todo el documento ------- LARSEN C P ET AL: "Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties" AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION 2005 DENMARK, vol. 5, no. 3, Marzo 2005 (2005-03), páginas 443-453, XP002393471 ISSN: 1600-6135 citado en la aplicación en todo el documento ------- ---/---	1-27
X		1-27

[X] Documentos adicionales se enlistan en la continuación del bloque C [X] Véase familia de patentes anexa.

* Categorías especiales de los documentos citados

"A" documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera ser de particular relevancia.

"E" documento anterior publicado en o después de la fecha de presentación internacional.

"L" documento el cual puede arrojar dudas sobre la(s) reivindicacion(es) de prioridad o el cual se cita para establecer la fecha de publicación de otra cita u otra razón especial (como se especifica)

"O" documento que se refiere a una descripción oral, uso, exhibición u otro medio

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y no en conflicto con la solicitud, pero citado para entender el principio o teoría fundamental de la invención.

"X" documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede ser considerada nueva o no se puede considerar que involucre una etapa inventiva cuando el documento es considerado de manera aislada.

"Y" documento de particular relevancia; no se puede considerar que la invención involucre unz etapa inventiva cuando el documento es combinado con uno o más de tales documentos, tal combinación sería obvia para una persona experimentada en la técnica.

"&" documento miembro de la misma familia de patentes.

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional	Fecha de envío del reporte de búsqueda internacional
4 Agosto 2006	22/08/2006
Nombre y dirección de correspondencia de la ISA European Patent Office ,PB. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel (+31-70)340-2040, Tx. 31 551 epo nl Fax: (+31-70)340-3016	Funcionario Autorizado Valcarcel, R

Forma PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Abril 2005)

No. de solicitud internacional PCT/US2006/012648	

C. DOCUMENTOS QUE SE CONSIDERA QUE SON RELEVANTES (Continuación)

Categoría	Cita del documento, con indicación, en donde sea apropiado, de los pasajes relevantes	Relevante para la Reiv. No.
X	ADAMS A B ET AL: "CALCINEURIN INHIBITOR-FREE CD28 BLOCKADE-BASED PROTOCOL PROTECTS ALLOGENEIC ISLETS IN NONHUMAN PRIMATES" DIABETES, NEW YORK, NY, US, vol. 51, no. 2, Febrero 2002 (2002-02), páginas 265-270, XP008054843 ISSN: 0012-1797 citado en la aplicación en todo el documento	1-27
X	ADAMS ANDREW B ET AL: "Development of a chimeric anti-CD40 monoclonal antibody that synergizes with LEA29Y to prolong islet allograft survival" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 174, no. 1, 1 Enero 2005 (2005-01-01), páginas 542-550, XP002393472 ISSN: 0022-1767 en todo el documento	1-27
X	WO 02/094202 A (EMORY UNIVERSITY; LARSEN, CHRISTIAN, P; PEARSON, THOMAS, C; ADAMS, AND) 28 Noviembre 2002 (2002-11-28) en todo el documento	1-27
P,X	VINCENTI FLAVIO ET AL: "Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation." THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE. 25 AUG 2005, vol. 353, no. 8, 25 Agosto 2005 (2005-08-25), páginas 770-781, XP009070530 ISSN: 1533-4406 en todo el documento	1-27

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de solicitud internacional
PCT/US2006/012648

Bloque I Observaciones en donde ciertas reivindicaciones se encontraron inescrutables (Continuación del ítem 1 de la primera hoja)

Este reporte internacional no ha sido establecido con respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2) del PCT por las siguientes razones:

1. [X] Reivindicaciones Nos.:
debido a que se relacionan con temas que no requieren ser buscados por esta Autoridad, a saber:
Aunque las reivindicaciones 1-27 estan dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición.

2. [ ] Reivindicaciones Nos.:
debido a que se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requerimientos prescritos a tal extensión que ninguna búsqueda internacional significativa se puede llevar a cabo, específicamente:

3. [ ] Reivindicaciones Nos.:
debido a que son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de acuerdo con las segundas y terceras oraciones de la Regla 6.4(a).

Bloque II Observaciones en donde se carece de unidad de la invención (Continuación del ítem 2 de la primera hoja)

La Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples invenciones en esta solicitud internacional, como sigue:

1. [ ] Ya que todas las cuotas de búsqueda adicionales fueron pagadas a tiempo por la solicitante, este reporte de búsqueda cubre todas las reivindicaciones escrutables.
2. [ ] Ya que todas las reivindicaciones escrutables pudieron ser buscadas sin esfuerzo que justifique una cuota adicional, esta Autoridad no invita al pago de ninguna cuota adicional.
3. [ ] Ya que solamente algunas de las cuotas de búsqueda adicionales requeridas fueron pagadas oportunamente por la Solicitante, este reporte de búsqueda internacional cubre solamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron Cuotas, específicamente las reivindicaciones Nos.:

4. [ ] Ninguna cuota de búsqueda adicional requerida fue pagada oportunamente por la solicitante. Consecuentemente, este Reporte de búsqueda internacional está restringido a la invención primero mencionada en las reivindicaciones; está Cubierta por las reivindicaciones Nos.:

Observación en protesta
[ ] Las cuotas de búsqueda adicionales estuvieron acompañadas por la protesta de la solicitante.
[ ] Ninguna protesta acompañó el pago de las cuotas de búsqueda adicional.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. De solicitud internacional
PCT/US2006/012648

Documento de patente citado en el Reporte de Búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patente(s)		Fecha de publicación
WO 03088991 A	30-10-2003	AU	2003243152 A1	03-11-2003
		CA	2482042 A1	30-10-2003
		EP	1496931 A1	19-01-2005
WO 02094202 A	28-11-2002	CA	2447921 A1	28-11-2002
		CZ	20033188 A3	13-04-2005
		EP	1397153 A2	17-03-2004
		HU	0401590 A2	29-11-2004
		JP	2004535402 T	25-11-2004
		MX	PA03010568 A	07-03-2005
		NO	20035176 A	05-01-2004
		PL	364578 A1	13-12-2004

TRATADO DE COOPERACION EN MATERIA DE PATENTES

00228

De la
AUTORIDAD EXAMINADORA PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para: ver forma PCT/ISA/220	**PCT** **OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL** (Regla 43*bis*.1 PCT)
	Fecha de envío (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)
Referencia de archivo del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220	**PARA ACCIÓN ADICIONAL** Ver párrafo 2 siguiente

No. de solicitud internacional	Fecha de presentación internacional (día/mes/año)	Fecha de prioridad (día/mes/año)
PCT/US2006/012648	05.04.2006	06.04.2005

Clasificación de Patente Internacional (IPC) o ambos clasificación nacional e IPC
INV. A61K38/17

Solicitante
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

1. Esta opinión contiene las indicaciones relacionadas a los siguientes incisos:
   - ☒ Cuadro No. I Bases de la Opinión
   - ☒ Cuadro No. II Prioridad
   - ☒ Cuadro No. III Sin establecimiento de la opinión con respecto a la novedad, etapa inventiva y aplicabilidad industrial
   - ☐ Cuadro No. IV Carente de unidad de la invención
   - ☒ Cuadro No. V Declaración razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, etapa inventiva y aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que soportan esta declaración.
   - ☐ Cuadro No. VI Ciertos documentos citados
   - ☐ Cuadro No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional
   - ☐ Cuadro No. VIII Ciertas observaciones en la solicitud internacional

2. **ACCIÓN ADICIONAL**

   Si se hace una demanda para el examen preliminar internacional, esta opinión será considerada ser una opinión escrita de la Autoridad de Examen Preliminar Internacional ("IPEA") a menos que ese esto no aplique donde el aspirante elige una Autoridad de otra manera que uno sea la IPEA y la IPEA elegida haya notificado a la Oficina Internacional bajo la Regla 66.1bis(b) donde las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional no serán así consideraba.

   Si esta opinión es, como la provista anteriormente, considerada para ser una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a someter a la IPEA una reapuesta escrita a la vez, cuando sea apropiado, con enmiendas, antes de la expiración de 3 meses a partir de la fecha del correo de la forma PCT/ISA/220 o antes de la expiración de 22 meses a partir de la fecha de prioridad, cualquiera expira más adelante.

   Para otras opciones, ver Forma PCT/ISA/220.

3. Para otros detalles, ver notas para la Formar PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de correspondencia de la ISA	Fecha de en que se complementó de esta opinión	Oficial autorizado
Oficina de Patentes Europea D-80298 Munich Tel: +49 89 2399 – 0 Tx: 52655 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	ver forma PCT/ISA/210	Valcarcel, R Teléfono No. +49 89 2399-2358

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de Solicitud
PCT/US2006/012648

Cuadro No. I Bases de la opinión

1. Con respecto al **idioma**, esta opinión se estableció basada sobre las bases de:
   - ☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual ha sido llenado
   - ☐ Esta opinión se estableció basado en la traducción del idioma original en el siguiente idioma, que es el idioma de una traducción proporcionada para los propósitos de la búsqueda internacional (bajo las Reglas 12.3 y 23.1 (b)).

2. Con respecto a cualquier **secuencia nucleótido y amino ácido** publicada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada esta opinión se estableció basada en:

a. tipo de material:
   - ☒ un listado de secuencia
   - ☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:
   - ☒ en formato escrito
   - ☐ en forma leíble en computadora

c. tiempo de limite/proporcionar:
   - ☒ contenido en la solicitud internacional como se archivo.
   - ☒ archivado junto con la solicitud internacional en forma leíble en computadora.
   - ☐ proporcionado subsecuencialmente para esta autoridad para el propósito de búsqueda.

3. ☐ Además, en el caso que más de una versión o copia del listado de secuencia y/o en relación a la misma tabla se archivo o proporciono, las declaraciones requeridas de la información en las copias subsecuentes o adicionales son idénticas a esa solicitud archivada o no va más allá de la solicitud archivada, como apropiadamente, fue proporcionada.

4. Comentarios adicionales:

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de Solicitud
PCT/US2006/012648

Cuadro No II. Prioridad

1. ☒ No se ha considerado la validez de la reivindicación de prioridad porque la Autoridad encargada de la búsqueda internacional no dispone de una copia de la solicitud anterior cuya prioridad se ha reivindicado, o en su caso, de una traducción de dicha solicitud anterior. Sin embargo, se ha establecido esta opinión asumiendo que la fecha pertienente (Reglas 43bis.1 y 64.1) es la fecha de prioridad reivindicada.
2. ☐ La presente invención se ha formulado como si no se hubiese reivindicado ninguna prioridad, debido a que no se ha considerado valida la reivindicación de prioridad (Reglas 43bis.1 y 64.1). En consecuencia, a los efectos de la presente opinión, se considera como fecha pertinente la fecha de presentación internacional indicada más arriba.
3. Observaciones adicionales, si es necesario:

Cuadro No. III. Sin establecimiento de la opinión con respecto a la novedad, etapa inventiva y aplicabilidad industrial.

1. Las cuestiones de sí la invención reivindicada parece que es nueva, que comprende una etapa inventiva (que sea obvio), o que es aplicable industrialmente no serán examinadas con respecto de:

☐ la solicitud internacional completa

☒ reivindicaciones Nos. 1-27 (solo de aplicabilidad industrial)
debido a que:

☒ la solicitud internacional, o las reivindicaciones Nos. 1-27 se relacionan al siguiente tema que no requiere un examen preliminar internacional (*especifica*):
ver hoja separada

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (indicar los elementos particulares a continuación) o las reivindicaciones Nos. _____ no son claras de modo que no se puede formar una opinión (especifica):

☐ las reivindicaciones, o las reivindicaciones Nos. ____ se soportan inadecuadamente por la descripción de modo que no se puede formar una opinión significante.

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

No. de Solicitud
PCT/US2006/012648

☐ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para las reivindicaciones Nos.

☐ el listado de secuencias del nucleótido y/o aminoácidos no cumple con el estándar proporcionado para un Anexo C de las Instrucciones Administrativas en que:

la forma escrita	☐ no se ha suministrado
	☐ no cumple con el estándar
la forma legible por computadora	☐ no se ha suministrado
	☐ no cumple con el estándar

☐ las tablas relacionadas el listado de secuencias del nucleótido y/o aminoácidos, si solo en la forma legible por computadora, no cumplen con los requisitos técnicos proporcionados para el Anexo C – bis de las Instrucciones Administrativas

☒ ver hoja separada para detalles adicionales

Cuadro No. V Declaración razonada bajo el Artículo 43bis.1(a)(I) con respecto a la novedad, etapa inventiva o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que soportan esta declaración.

---

1. DECLARACIÓN

Novedad (N)	Sí: Reivindicaciones	Ninguna
	No: Reivindicaciones	1-27
Etapa Inventiva (EI)	Si: Reivindicaciones	Ninguna
	No: Reivindicaciones	1-27
Aplicabilidad Industrial (AI)	Si: Reivindicaciones	Ninguna
	No: Reivindicaciones	Ninguna

2. Citas y Explicaciones :

ver hoja separada

Re punto III

Las reivindicaciones 1-27 se refieren a la materia objeto considerada por esta autoridad a ser cubierta por las provisiones de la Regla 67.1 (iv)PCT. Consecuentemente, no se formulara opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Articulo 34(4)(a)(I)PCT).

Re punto V

1. La numeración de los documentos corrresponde al orden en que fueron citados en el Reporte de Busqueda Internacional.

Falta de Claridad

2. La presente solicitud no cumple los requerimientos del Articulo 6 PCT ya que la terminologia referida a continuación usada en las reivindicaciones no es clara.

2.1 No es claro que significa la expresión "visita a la semana n" y " objetivo a traves del suero". Por lo tanto, todas las reivindicaciones referidas a este término no son claras. Se notara que el significado de las reivindicaciones debe ser claro de la redacción de las reivindicaciones por si solas.

2.2 La reivindicación 25 se refiere a la metionina en la posición 27 (la cuál parece corresponder a la posición +1 de la Figura 7 de la presente solicitud) y terminar en +357 o +356 de la figura 7. Por lo tanto, la reivindicación 25 se refiere a dos diferentes numeraciones: la primera, empezando desde la primer metionina N-terminal de la Figura 7 (posición –26 de acuerdo a la numeración al margen derecho de la Figura 7); y la segunda numeración con respecto al margén derecho de la Figura 7.

2.3 Se notara que el mutante definido en la reivindicación 1 de la presente solicitud, ha sido descrito en el arte previo con la nomenclatura variada. La figura 7 de PA corresponde al mutante CTLA que tiene dos mutaciones A55A y L130E, por lo tanto, también correspondiendo al mutante CTLA4 llamado LEA29Y (o belatacept) en los documentos del arte previo. Esta mutación también es llamada L104EA29Yig (SEQ ID NO:4) en la presente solicitud.

Falta de Novedad

3. La presente solicitud no cumple con los criterios del Articulo 33(1)PCT, **debido a que la materia objeto de las reivindicaciones 1-27 no es nueva** en el sentido del Articulo 33(2)PCT.

3.1 La Figura 19 de D1 describe un mutante soluble CTLA4 que tiene las siguientes mutaciones A55Y y L130E (posición 55 correspondiente a la posición +29 de acuerdo a la numeración de la figura 19 y la posición 130 correspondiendo a la posición +104 de acuerdo a la numeración de la figura 19). Se notara que la Figura 19 de D1 es identica a la figura 7 de la presente solicitud. Este mutante es denominado L104EA29Yig, siendo un sinomino de LEA29Y y LEA (ver ejemplo 3 en la página 95).

Además las reivindicaciones 51, 53 y 54 de D1 describen métodos para tratar un transtorno inmune asociado con el transplante de injertos que comprende administrar a un sujeto una dosis efectiva de un mutante CTLA4 L104EA29Yig que tiene la secuencia mostrada en la Figura 19 (SEQ ID NO:9) iniciando con la metionina en la posición +1 o con la alinina en la posición –1 y terminando con la lisina en la posición +357. La reivindicación 52 describe un método como justo se describe pero en donde el mutante CTLA4 comprende un fragmento del polipéptido de la figura 19 iniciando con la metionina en la posición +1 o con la alinina en la posición –1 y terminando con el ácido aspartico en la posición +124.

Más aún , en la página 37 (líneas 5-9) y la página 69(líneas 4-12) se da una definición para una cantidad efectiva de los mutantes CTLA4 a ser usados, y también se describe que pueden ser administrados diario, semanalmente, mensualmente y/o anualmente, en una vez o varias veces por hora/día/semana/mes/año dependiendo de la necesidad. Por ejemplo, en una modalidad, la molecula puede inicialmente ser administrada una vez cada dos semanas por un mes, y despues una vez al mes. Este regimen de administración falla dentro del alcance de las reivindicaciones 1-6 de la presente solicitud. Las cantidades descritas en las reivindicaciones 51-54 de D1 también fallan dentro del alcance de las reivindicacines 7 y 8 de la presente solicitud. También los regimenes referidos a en las reivindicaciones 9-11 de la presente solicitud parecen coincidir con el regimen descrito en la página 69 de D1.

D1 adicionalmente describe trastornos inmunes asociados con el transplante de injerto, y rechazo que comprende organo solido, tejido y/o transplante /rechazo de células y/o tejido.(como transplante rechazo de riñon).

D1 también describe la fusión de L104EA29Y a una porción de inmunoglobulina (ver por ejemplo, reivindicación 51 en donde L104EA29Yig es usado en métodos de tratamiento). Sobre la reivindicación 52 de D1 un fragmento que comprende hasta un ácido aspartico en la posición +124 es fusionado a Ig. Esto parece ser el mismo acido aspartico referido en la reivindicación 21 de la presente solicitud como esta en la posición 150.
D1 también describe la administración combinada de mutantes CTL4 con otros compuestos tal que los farmacos esteroides no inflamatorios, corticosteroides, etc (ver, por ejemplo, páginas 52, 61, 70 o 105), en particular basiliximab (ver página 70, línea 5).

Ya que el uso de los mutantes CTLA4 ayudan en la prevención del transplante-rechazo renal o de isleta una progresión reducida de diabetes, o hipertensión es descrita (como se refiere en la reivindicación 23 de la presente solicitud).

Por lo tanto, **D1 es perjudicial a la novedad de las reivindicaciones 1-23, 25 y 26 de la presente solicitud.**

3.2 D2 describe el uso de LEA29Y (belatacept) en métodos para tratar un trastorno inmune asociado con el transplante de injerto (aloinjertorenal, ver resumen). LEA29Y fue administrado intra-operativamente (10 mg/kg IV), en el día 4 (15 mg/kg) y post-operativo los días 14,28,42,56 y 70 (20 mg/kg IV), ver página 4445 columna izquierda hacia la mitad del primer parrafo). Además, la molécula mutante fue co-adminstrada con otros agentes tal como metilprednisolona (d0: 20 mg, d4, 4mg) y basiliximab (0.3 mg/kg a d0 y d4) ver página 445, columa izquierda hacia el final del primer parrafo). Por lo tanto D2 es perjudicial a al menos la novedad de las reivindicaciones 1-3,7, 22 y 25 de la presente solicitud.

3.3 D3 describe el uso de un mutante LEA29Y en métodos para inducir la inmunosupresión a ser usada en el transplante de isleta para tratar la diabetes. LEA29Y fue administrada intravenosamente intra-operativamente (10 mg/kg) y en el día postoperativo (POD) 4 (15 mg/kg). Dosis adicionales de 20 mg/kg fueron dadas en POD 14 y cada 2 semanas hasta POD 154. Por

lo tanto, D3 es también perjudicial a la novedad de las reivindicaciones 1-3 y 25 de la presente solicitud.

3.4 D4 describe el uso de LEA29Y para inducir la inmunosupresión en el transplante de una isleta de primates. LEA29Y fue adminstrado intraoperativamente (20 mg/kg); en los días postoperatorios 4, 7 y 14, después cada 2 semanas hasta el día 100. Dosis adicionales (20 mg/kg); fueron administradas mensualmente por seis meses (ver página 544, columna izquierda, primer parrafo). Por lo tanto, D4 es también perjudicial para la novedad de las reivindicaciones 1-3 y 25 de la presente solicitud.

3.5 D5 describe métodos parainhibir el transplante rechazo de células de isleta en un sujeto que comprende el uso de mutantes CTLA4, tal como L104EA29Yig (ver la reivindicación 2). El regimen de administración ejemplificado por L104EA29Yig en la página 65 (líneas 24-27) parece fallar bajo el alcanze de las reivindicaciones 1-8 de la presente solicitud.

El suero a traves del nivel de concentración en este ejemplo es tal que es mayor que 30 µg/ml. Ya que la reivindicación 24 de la presente solicitud se refiere a "alrededor" 30 µg/ml (tal "alrededor" resulta ser un término impreciso), el suero a traves del nivel es considerado por caer dentro del alcance de la reivindicación 24 de la presente solicitud.

D5 describe adicionalmente la administración simultanea de los mutantes CTLA4 con otros farmaos tal como basiliximab (ver página 42m, líneas 19 y 20), o siroliums(ver página 65, línea 19).

Uno de los efectos de los métodos descritos en D5 reduce el desarrollo de la diabetes (ver página 67, líneas 15-28).

Por lo tanto, D5 es perjudicial a la novedad de las reivindicaciones 1-8, 12-19 y 22-27 de la presente solicitud.

Falta de actividad inventiva

4. La presente solicitud no cumple el criterio del Articulo 33(1)PCT, porque la materia objeto de las reivindicaciones 1-27 no involucra una actividad en el sentido del Articulo 33(3)PCT.

Como se discutio en las secciones previas, las reivindicaciones 1-27 no son novedosas. Además, se notara que la recitación del regimen de administración podria ser solo considerado inventivo en caso de un efecto inesperado podria ser asociado a un regimen particular . La persona experta en vista de D1 ó D5 podria haber sido capaz de usar el regimen de administración citado pero lo podria adaptar a la necesidad particular de cada paciente (ver página 39 de D5). Por lo tanto, en ausencia de un efecto inesperado de un regimen de administración dado, este regimen podria ser considerado como una alternativa meramente obvia a los regimenes conocidos.

Aún adicionalmente, si el regimen particular mostro un efecto inesperado para una aplicación terapeutica particular, solo reivindicaciones restringidas a una solicitud particular pueden serb inventivas. Este efecto particular es parecido ya que no puede ser aplicable a cualquier solicituds posible. Si un efecto no es expresado en una reivindicacvión pero es parte del problema a ser resuelto, y la reivindicación comprende modalidades no trabajadas, existe un problema de actividad inventiva.

El mismo razonamiento aplica a combinaciones de farmacos conocidos. Parece al presente, que las combinaciones particulares de los farmacos conocidos no podrian ser considerados inventivos ya que los compuestos mencionados son compuestos bien conocidos los cuales se usan de forma estandar. La persona experta , depende de las circunstancias podria ser capaz

de usar esa combinación sin involucrar una tecnica inventiva, especialmente como las ventajas conseguidas pueden ser facilmente logradas (por ejemplo usando combinanciones de compuestos comunmente usados en transplantes como inmunosupresantes).

Métodos de tratamiento

5. Del razonamiento de las presentes reivindicaciones 1-27 sobre la cuestión de que si son aplicables industrialmente, no existe un criterio unificado en los estados contactantes del PCT. La patentabilidad puede depender de la formulacion de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como aplicable industrialmente la materia objeto de las reivindicaciones al uso de un compuesto en un tratamiento médico, pero permite, sin embargo, reivindicaciones referidas a un compuesto conocido para primer uso en un tratamiento médico y el uso de tal compuesto para la manufactura de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL (HOJA SEPARADA)

No. de Solicitud
PCT/US2006/012648

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

00277

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: **A61K 38/17**
22) Fecha de solicitud:	(71)Solicitante(s) **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**
(30) Prioridad (31) ***No.*** **60/668,774** 32) ***Fecha*** **06/04/05** (33) ***País*** **US**	(72) Inventor(es) **HAGERTY, David y RUSNAK, James**
	(74) Apoderado: **ALVARO CORREA ORDOÑEZ**
(85) Fecha limite inicio fase nacional: **06/11/07** (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: ***05/04/06*** No. de solicitud **PCT/US2006/012648**	(87) Publicación internacional Fecha: ***12/10/06*** N° publicación: **WO/2006/108035**

(54) Titulo: **METODOS PARA TRATAMIENTO DE TRASTORNOS INMUNES ASOCIADOS CON TRASPLANTE DE INJERTO CON MOLECULAS MUTANTES CTLA4 SOLUBLES**

Reivindicación(es):

1. Método para el tratamiento de un trastorno inmune asociado con el trasplante de injerto, caracterizado porque comprende: administrar a un sujeto una dosis efectiva de una molécula mutante de CTLA4 que comprende el dominio extracelular de CTLA4 como se muestra en la SEC ID NO: 8 que empieza con la alanina en la posición 26 o la metionina en la posición 27 y que finaliza con el ácido aspártico en la posición 150, o una porción de la misma, en donde en el dominio o porción extracelular de la misma, una alanina en la posición 55 está substituida con una tirosina, y una leucina en la posición 130 está substituida con un ácido glutámico y en donde el régimen de administración comprende un régimen de fase inicial, en donde el régimen de fase inicial puede variar desde los primeros 3 hasta 6 meses post-trasplante e involucra la administración que inicialmente es más frecuente que mensualmente.

142

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-104769- -00000-0000

Fecha: 2007-10-05 16:14:12 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 379

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [ ] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Descripción de la invención [ ]
- Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Edgar Nocano

Firma Responsable

05 OCT. 2007

Fecha

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

243

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 381

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
CORREA ORDOÑEZ ALVARO
Apoderado(a) y/o Representante de
BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

REFERENCIA	Radicación No.	07 104769
	Solicitud internacional	PCT/US2006/012648
	Fecha inicio fase nacional	06/11/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	4655
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

jfernand