



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-301377- -00000-0000

Fecha: 2013-12-27 15:26:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 195

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DE

**PATENTE DE INVENCION
PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL**

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO: INHIBIDORES DE LA ACTIVACION DE LAS CELULAS T

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL: A61K 39/395

71. SOLICITANTE: GENZYME CORPORATION

DOMICILIO: 500 Kendall Street, Cambridge,
Massachusetts 02142, ESTADOS UNIDOS DE
AMERICA

74. APODERADO: Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.

22. BOGOTA, D.C., 27 DIC. 2013



No. 13-301377- -00000-0000

Fecha: 2013-12-27 15:26:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 195

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de Invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/045017	Fecha 29/06/2012
Publicación Internacional No.		WO 2013/003761 A1	Fecha 03/01/2013
3	(54) TITULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
INHIBIDORES DE LA ACTIVACION DE LAS CELULAS T			
4	CLASIFICACION INTERNACIONAL (51) CIP		
A61K 39/395			
5	(71) SOLICITANTE(S) ☐ Esta persona también es inventor Para datos adicionales utilizar hoja de información adicional		
APELLIDOS O RAZON SOCIAL GENZYME CORPORATION		NOMBRE	IDENTIFICACION TIPO
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCION CIUDAD DEPARTAMENTO/ESTADO PAIS DE RESIDENCIA		500 Kendall Street Cambridge Massachusetts 02142 ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	No. TELEFONO E-MAIL NACIONALIDAD O ESTADOUNIDENSE LUGAR DE CONSTITUCION
7	(72) INVENTOR(ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información adicional		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. ZHU	Yunxiang	ESTADOUNIDENSE	
2. KARMAN	Jozsef	ESTADOUNIDENSE	
3. WEI	Ronnie	ESTADOUNIDENSE	
4. JIANG	Canwen	ESTADOUNIDENSE	
5. CHEN	Seng	CHINA	
DIRECCION DE CORREO ELECTRONICO:			
8	DATOS INVENTOR(ES)		
PAIS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCION
1. ESTADOS UNIDOS	MA 01778	Wayland	10 Caulfield Road
2. ESTADOS UNIDOS	MA 02301	Brockton	419 Main Street
3. ESTADOS UNIDOS	MA 02494	Needham	120 Central Avenue
4. ESTADOS UNIDOS	MA 01772	Southborough	14 Heather Lane
5. ESTADOS UNIDOS	MA 01760	Natick	10 Jennison Circle
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/U OTRO(S) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o demás inventores se indican en una hoja a continuación			
9	(74) ☐ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACION	
CASTELLANOS ABONDANO	MARGARITA	C.C. 39.779.654 T.P. 70.819	
DIRECCION	Calle 94A No. 7A-09	No. TELEFONO 7560770	
CIUDAD	BOGOTA	E-MAIL sic@castellanosyco.co	
PAIS	COLOMBIA	No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
1. 2. 3.	(33) PAIS DE ORIGEN ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	CODIGO PAIS US	(31) NUMERO 61/503,282	(32) FECHA (AAA/MM/DD) 2011/06/30
11	DECLARACION SOBRE USO DE RECURSOS GENETICOS O BIOLOGICOS			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen. ☐ SI ☒ NO NOTA: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACION SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina. ☐ SI ☒ NO NOTA: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCION DE TASAS			
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente ☐ SI ☒ NO NOTA: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas		Universidades públicas o privadas		Entidades sin animo de lucro
Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.		Copia de registro vigente en Cámara de Comercio.
Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.				Hoja de información complementaria.
				Otros, especificar.
14	AUTORIZACION DE NOTIFICACION EN LINEA ☐ SI ☒ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deber ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.				
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRONICO	N° 13-120651, 13-130560	Fecha: Noviembre 26 de 2013 y Diciembre 17 de 2013	
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)				
 MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO - APODERADO 27 DIC. 2013				
16	ORDEN Y RELACION DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD			
Documentación Técnica		Documentación Jurídica		
Solicitud Internacional en Castellano				
1.	☒ Descripción	N° de folios: 74		
2.	☒ Reivindicaciones	N° de reivindicaciones: 34		
3.	☒ Dibujos y/o figuras	N° de folios: 12		
4.	☒ Resumen			
5.	☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.			
6.	☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.			
7.	☒ Arte final 12 x 12			
8.	☐ Anexo formato digital.			
9.	☒ Poderes, si fuera el caso.			
10.	☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.			
11.	☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.			
12.	☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.			
13.	☐ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.			
14.	☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.			
15.	☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad			
16.	☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.			
17.	☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.			

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

**Industria y Comercio**
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 120651

Bogotá D.C., Noviembre 26 de 2013 - 08:12:28

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	115788	14/11/2013		125.000.00
RECIBO DE CA	999999999	119278	21/11/2013		125.000.00
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	406302105	25/11/2013	3.505.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
			<u>\$500.000.00</u>

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

**No. 13-301377- -00000-0000**

Fecha: 2013-12-27 15:26:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 195

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Noviembre 26 de 2013 - 08:12:29

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 130560

Bogotá D.C., Diciembre 17 de 2013 - 15:19:38

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO

NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	542730123	17/12/2013	4.143.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
24	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	720.000.00
				\$720.000.00

SON: **SETECIENTOS VEINTE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

-*****-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-301377- -00000-0000

Fecha: 2013-12-27 15:26:02

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 195

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Diciembre 17 de 2013 - 15:19:38

COLOMBIA

PODER

El (los)

Domiciliados en

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial e intelectual y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

- a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas de certificación o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
- ~~b) Para la obtención de protección de variedades vegetales~~
- ~~c) Para la obtención de registros sanitarios;~~
- d) Para la obtención de registros de derechos de autor.
- e) Para obtener registros y transferencias de nombres de dominio
- f) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato entre los apoderados, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extra-judiciales. .

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy

en

por

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned GENZYME CORPORATION

Of 500 Kendall Kendall Street
Cambridge, Massachusetts 02142
United States

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS a.** attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, to and to obtain the protection of my (our) Intellectual Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

- a) Obtainment of patents, models and designs, registration of trademarks, service, collective, certification and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns; its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
- ~~b) For the obtainment of plant variety protection~~
- ~~c) For the obtainment of Sanitary registrations;~~
- d) For the obtainment of copyright registrations
- e) For domain name registrations and assignment
- f) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

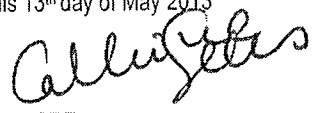
In all the above matters they may substitute this power of attorney within the appointed attorneys, compromise, cancel, receive, withdraw, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney.

Given and signed this 13th day of May 2013

in Antony

by Catherine GILLES-FORT
Proxy Holder



CASTELLANOS & Co.
INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM

CALLE 94 A No. 7 A – 09 / P.O. BOX 6349
PHONE (57 1) 756 07 70 / FAX (57 1) 755 01 58
BOGOTÁ D.C. COLOMBIA
info@castellanosyco.co

ASSIGNMENT BY INVENTOR

THIS ASSIGNMENT, made this 8th day of June, 2012, by Yunxiang Zhu, Jozsef Karman, Ronnie Wei, Canwen Jiang, and Seng Cheng (hereinafter referred to as Assignors), residing at 10 Caulfield Road, Wayland, MA 01778, 419 Main Street, Brockton, MA 02301, 120 Central Avenue, Needham, MA 02494, 14 Heather Lane, Southborough, MA 01772, and 10 Jennison Circle, Natick, MA 01760;

WHEREAS, Assignor has invented certain new and useful improvements in INHIBITORS OF T-CELL ACTIVATION, set forth in a Provisional application for Letters Patent of the United States, June 30, 2011, 61/503,282 and

WHEREAS, GENZYME CORPORATION, a corporation organized under and pursuant to the laws of Massachusetts having its principal place of business at 500 Kendall Street, Cambridge, Massachusetts 02142 (hereinafter referred to as Assignee), is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to said inventions and said Application for Letters Patent of the United States, and in and to any Letters Patent of the United States to be obtained therefore and thereon.

NOW, THEREFORE, for good and sufficient consideration, the receipt of which is hereby acknowledged, Assignor has sold, assigned, transferred and set over, and by these presents does sell, assign, transfer and set over, unto Assignee, its successors, legal representatives and assigns, the entire right, title and interest in and to the above-mentioned inventions and application for Letters Patent, and in and to any and all direct and indirect divisions, continuations and continuations-in-part of said application, and any and all Letters Patent in the United States and all foreign countries which may be granted therefor and thereon, and reissues, reexaminations and extensions of said Letters Patent, and all rights under the International Convention for the Protection of Industrial Property, the same to be held and enjoyed by Assignee, for its own use and benefit and the use and benefit of its successors, legal representatives and assigns, to the full end of the term or terms for which Letters

Patent may be granted and/or extended, as fully and entirely as the same would have been held and enjoyed by Assignor, had this sale and assignment not been made.

AND for the same consideration, Assignor hereby represents and warrants to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that, at the time of execution and delivery of these presents, except for any rights, titles and/or interests that have arisen to Assignee under law or that have already been transferred to Assignee, Assignor is the sole and lawful owner of the entire right, title and interest in and to the said inventions and application for Letters Patent above-mentioned, and that the same are unencumbered and that Assignor has good and full right and lawful authority to sell and convey the same in the manner herein set forth.

AND for the same consideration, Assignor hereby covenants and agrees to and with Assignee, its successors, legal representatives and assigns, that Assignor will sign all papers and documents, take all lawful oaths and do all acts necessary or required to be done for the procurement, maintenance, enforcement and defense of any Letters Patent and applications for Letters Patent for said inventions, without charge to Assignee, its successors, legal representatives and assigns, whenever counsel of Assignee, or counsel of its successors, legal representatives and assigns, shall advise: that any proceeding in connection with said inventions, or said Patent application for Letters Patent, or any proceeding in connection with any Letters Patent or applications for Letters Patent for said inventions in any country, including but not limited to interference proceedings, is lawful and desirable; or, that any division, continuation or continuation-in-part of any application for Letters Patent, or any reissue, reexamination or extension of any Letters Patent, to be obtained thereon, is lawful and desirable.

AND Assignor hereby requests the Commissioner of Patent and Trademarks to issue said Letters Patent of the United States to Assignee, as Assignee of said inventions and the Letters Patent to be issued thereon, for the sole use and benefit of Assignee, its successors, legal representatives and assigns.

AND Assignor hereby grants the following individuals the power to insert on this Assignment any further identification which may be necessary or desirable in order

to comply with the rules of the United States Patent and Trademark Office for
recordation of this document:

EDWARDS WILDMAN PALMER LLP

All practitioners at Customer Number 21874

AND Assignor acknowledges an obligation of assignment of this invention to
Assignee at the time the invention was made.

[Signature]
Yunxiang Zhu

Date: 5/31/2012 A citizen of Massachusetts
United States of America)
State of Massachusetts) ss.:
County of Middlesex)

CLS

On this 31 day of May, 2012, before me personally came Yunxiang Zhu, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.



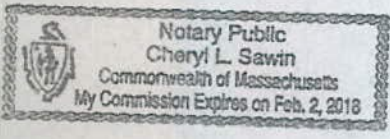
Cheryl L. Sawin
Notary Public

[Signature]
Jozsef Karman

Date: 05/31/2012 A Citizen of Massachusetts
United States of America)
State of Massachusetts) ss.:
County of Middlesex)

CLS

On this 31 day of May, 2012, before me personally came Jozsef Karman, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.



Cheryl L. Sawin
Notary Public

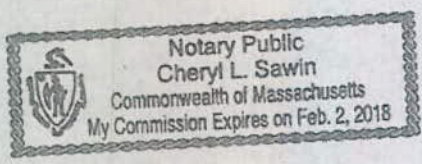
Ronnie Wei
Ronnie Wei

Date: June 8, 2012 A Citizen of China, P.R.

United States of America)
State of Massachusetts) ss.:
County of Norfolk)

On this 8th day of June, 2012, before me personally came Ronnie Wei, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Cheryl L. Sawin
Notary Public



Canwen Jiang

Date: A Citizen of

China)
State of) ss.:
County of)

On this day of 2012, before me personally came Canwen Jiang, to me known to be the individual described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution of the same.

Notary Public

Ronnie Wei

Date: June 29, 2012 A Citizen of the United States of America

United States of America)
State of Massachusetts) ss.:
County of Norfolk)

On this 29th day of June, 2012, before me
personally came Ronnie Wei, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

Notary Public



Canwen Jiang

Date: June 8, 2012 A Citizen of USA

United States of America)
State of MASSACHUSETTS) ss.:
County of WORCESTER)

On this _____ day of _____, 2012, before me
personally came Canwen Jiang, to me known to be the individual
described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
of the same.

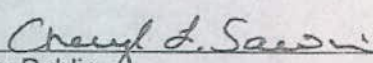
Notary Public



Seng Cheng

Date: 6/5/2012 A Citizen of Massachusetts
 United States of America
 State of Massachusetts) ss.:
 County of Middlesex)

On this 5 day of June, 2012, before me
 personally came Seng Cheng, to me known to be the individual
 described in and who executed the foregoing instrument, and acknowledged execution
 of the same.


 Notary Public



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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
3 January 2013 (03.01.2013)



(10) International Publication Number
WO 2013/003761 A1

- (51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/045017

(22) International Filing Date:
29 June 2012 (29.06.2012)

(25) Filing Language:
English

(26) Publication Language:
English

(30) Priority Data:
61/503,282 30 June 2011 (30.06.2011) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): GENZYME CORPORATION [US/US]; 500 Kendall Street, Cambridge, MA 02142 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ZHU, Yunxiang [US/US]; 10 Caulfield Road, Wayland, MA 01778 (US). KARMAN, Jozsef [US/US]; 419 Main Street, Brockton, 02301 (US). WEI, Ronnie [US/US]; 120 Central Avenue, Needham, 02494 (US). JIANG, Canwen [US/US]; 14 Heather Lane, Southborough, 01772 (US). CHEN, Seng [CN/US]; 10 Jennison Circle, Natick, 01760 (US).

(74) Agents: CHACLAS, George, N. et al.; Edwards Wildman Palmer LLP, P.O. Box 55874, Boston, MA 02205 (US).

[Continued on next page]

(54) Title: INHIBITORS OF T-CELL ACTIVATION

(57) Abstract: The present invention provides a bispecific biologic comprising a ligand specific for CTLA-4 and a ligand specific for a pMHC complex.

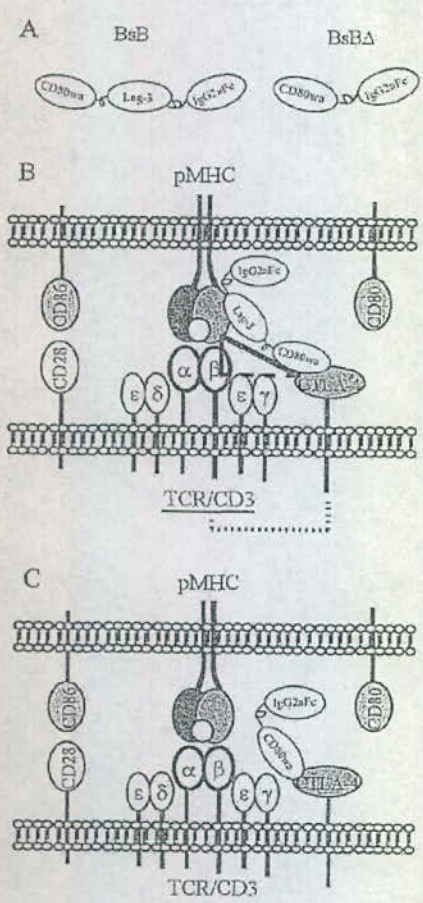


Figure 1

WO 2013/003761 A1

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

(84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,

GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

Inhibitors of T-cell activation

Cross-reference to Related Application

This application claims the benefit of the following U.S. Provisional Application No.: 61/503,282, filed June 30, 2011, the entire contents of which are incorporated herein
5 by reference.

Background of the Invention

Cell therapy using freshly isolated, *ex vivo* expanded or *in vitro* induced Tregs in models of autoimmune diseases or organ transplants have demonstrated that adoptive transfer of Tregs can restore the balance of Tregs versus effector T cells, thereby
10 controlling autoimmunity associated with these diseases (Allan et al., (2008) *Immunol. Rev.* 223:391-421; Jiang et al., (2006) *Expert review of clinical immunology* 2:387-392; Riley et al., (2009) *Immunity* 30:656-665 ; Tang et al., (2012) *Journal of molecular cell biology* 4:11-21). However, the use of adoptive transfer as a therapeutic strategy presents several challenges to translation into the clinic. The
15 number of autologous Tregs that can be isolated from peripheral blood of a human subject is limiting and extensive *ex vivo* expansion of the Tregs may alter their functionality and/or purity. As the isolated Tregs are polyclonal, they can exert a pan-immune suppressive function on non-target effector T cells. Importantly, the plasticity of Tregs poses a significant challenge (Bluestone et al., (2009) *Nat Rev*
20 *Immunol* 9:811-816; Zhou et al., (2009a) *Curr Opin Immunol* 21:281-285), as adoptively transferred Tregs can lose Foxp3 expression and redifferentiate into Th17 cells (Koenen et al., (2008) *Blood* 112:2340-2352.) or pathogenic memory T cells (Zhou et al., (2009b) *Nat Immunol* 10:1000-1007) which raises the risk of aggravating the autoimmunity or inflammation.

25 A therapeutic that induces the generation of Tregs in an antigen-specific manner *in situ* would have advantages over adoptive Treg cell therapy. Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4; CD 152) is a well-established negative regulator of the T cell response, is important for the maintenance of T cell homeostasis and self-tolerance. CTLA-4 is homologous to the co-stimulatory molecule CD28 and shares
30 the same ligands, CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2), which are expressed on the surface of antigen presenting cells (APCs). However, differential binding of CD80/CD86 on

APCs to CD28 and CTLA-4 on effector T cells leads to opposing outcomes, with CD28 triggering T cell activation and CTLA-4 causing T cell inhibition.

Because CD28 is constitutively expressed on T cells and the expression of CTLA-4 is only induced following T cell activation, peaking 2-3 days later (Jago et al., (2004) *Clinical & Experimental Immunology*, 136: 463-471), extensive T cell activation would have occurred prior to CTLA-4 engagement. Hence, the main role of CTLA-4 is to act as a safeguard against an excessive T cell response rather than to inhibit T cell activation. However, early engagement of CTLA-4 by its ligand and its subsequent crosslinking to the T cell receptor (TCR) can prematurely dampen TCR signaling, causing T cell inhibition and hyporesponsiveness, or anergy. This concept has been validated experimentally using a variety of methods, including the following: (i) crosslinking T cell-activating antibodies (anti-CD3/antiCD28) using an agonistic anti-CTLA-4 antibody by co-immobilization on a bead or via a secondary antibody (Blair et al., (1998) *J. Immunol.* 160: 12-15; Krummel and Allison, (1996) *J Exp Med* 183:2533-2540; Walunas et al., (1996) *J. Exp. Med.* 183:2541-2550); (ii) molecularly engineering a surface-linked agonistic scFv against CTLA-4 on an APC (Fife et al., (2006) *J. Clin. Invest.* 116(8):2252- 61; Griffin et al., (2001) *J. Immunol. Methods.* 248(1-2):77-90; Griffin et al., (2000) *J. Immunol.* 164(9):4433-42); and (iii) chemically crosslinking antibodies that recognize specific antigens on an APC to an agonistic anti-CTLA-4 antibody (Li et al., (2007). *J. Immunol.* 179(8):5191-203; Rao et al., (2001) *Clin. Immunol.* 101(2):136-45; Vasu et al., (2004) *J. Immunol.* 173(4):2866- 76).

Restoring the balance of Tregs versus effector T cells is a promising means of treating autoimmune disease. However, cell therapy involving transfer of Tregs has certain limitations. Accordingly, therapeutics that can induce the generation of Tregs (e.g., CTLA-4) in an antigen-specific manner for the treatment of autoimmune disease are urgently required.

Summary of the Invention

The present invention relates to ligands which crosslink ligand-engaged cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) to the T cell receptor (TCR) during the early phase of T cell activation and thereby attenuate TCR signaling, leading to T cell inhibition. To develop an agent that can inhibit T cell activation, a bispecific fusion protein

comprising moieties that selectively bind and activate CTLA-4 and co-ligate it to the TCR was generated. In contrast to the approaches of the prior art, the bispecific fusion protein was engineered to crosslink MHC to CTLA-4; both are then drawn to the TCR, generating the CTLA-4/MHCII/TCR tri-molecular complex within the immune
5 synapses.

Crosslinking ligand-engaged cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) to the TCR with a bispecific fusion protein (BsB) comprising a mutant mouse CD80 and lymphocyte activation antigen-3 in an allogenic MLR attenuated TCR signaling and direct T cell differentiation towards Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs). As described
10 herein, antigen-specific Tregs can also be induced in an antigen-specific setting. Treatment of non-obese diabetic (NOD) mice with a short course of BsB moderately delayed the onset of autoimmune type 1 diabetes (T1D) with a transient increase of Tregs in blood. However, a longer course of treatment of NOD animals with BsB significantly delayed the onset of disease as well as reduced the incidence of animals
15 presenting with diabetes. Histopathological analysis of the pancreata of BsB-treated mice that remained non-diabetic revealed the presence of Tregs that were intermixed with other CD3⁺ T cells and non-T cell leukocytes around the islets. This peri-insulitis was associated with minimal invasive insulitis and no notable destruction of the insulin-producing β -cells. Thus, bifunctional proteins capable of engaging CTLA-4
20 and MHCII and indirectly co-ligating it to the TCR may induce antigen-specific Tregs in vivo to protect mice from T1D or other autoimmune diseases.

In particular, the invention describes bispecific fusion proteins which cross-link CTLA-4 to the pMHCII complex. *For example*, there is described a bispecific fusion protein comprising a mutant mouse CD80 (CD80w88a) and lymphocyte activation
25 antigen-3 (LAG-3) which is engineered to concurrently engage CTLA-4 and crosslink it to the TCR via pMHCII. In a first aspect, therefore, there is provided a bispecific biologic comprising a ligand specific for CTLA-4 and a ligand specific for a pMHC complex.

In one aspect, the invention provides a bispecific biologic comprising a ligand
30 specific for CTLA-4 and a ligand specific for a pMHC complex. The bispecific biologic according to the invention is capable of cross-linking CTLA-4, present on T-cells, with the peptide MHC (pMHC) complex on antigen-presenting cells (APC). The peptide MHC complex is bound by the cognate T-cell receptor (TCR) on T-cells,

meaning that the bispecific biologic according to the invention gives rise to a tripartite CTLA-4/MHC/TCR complex.

In various embodiments of the aspects delineated herein, the ligand specific for CTLA-4 is selected from an antibody specific for CTLA-4, and CD80 (B7-1) or CD86 (B7-2). In a particular embodiment, the antibody specific for CTLA-4, and CD80 (B7-1) or CD86 (B7-2) is an agonistic antibody. Antibodies specific for CTLA-4 can be engineered, and both CD80 and CD86 are natural ligands for CTLA-4. In one aspect, CD80 or a mutant thereof is used, since CD80 binds preferentially to CTLA-4 over CD28, and thus promotes T-cell inactivation as opposed to activation.

In various embodiments of the aspects delineated herein, the ligand specific for the pMHC complex can be selected from an anti-MHC antibody and LAG-3. The LAG-3 polypeptide is a natural ligand for the MHCII protein. In one embodiment, the MHC is MHC-II (which interacts with CD4⁺ T-cells). In another embodiment the MHC is MHC-I, which interacts with CD8⁺ T-cells.

In the bispecific biologic according to the invention, the ligand specific for CTLA-4 and the ligand specific for the pMHC complex are preferably spaced apart by a linker. The linker can take the form of one or more of a polyamino acid sequence and an antibody Fc domain. A suitable polyamino acid sequence is G9 (Gly-9).

In various embodiments of the aspects delineated herein, the ligand specific for CTLA-4 is CD80, or a mutant thereof which is mutated to increase specificity for CTLA-4 over CD28. In one embodiment, the mutated CD80 comprises one or more mutations selected from W88A, K75G, K75V, S112G, R126S, R126D, G127L, S193A, and S204A, using sequence numbering in mouse CD80 precursor, or their human CD80 counterparts (W84A, K71G, K71V, S109G, R123S, R123D, G124L, S190A, and S201A) and in addition R63A, M81A, N97A, E196A.

In one embodiment, the bispecific biologic comprises CD80, which comprises the mutation W84A (human) or W88A (mouse).

In a particular embodiment, the ligand specific for the MHCII complex is LAG-3. Advantageously, LAG-3 is mutated to increase specificity for pMHCII. *For example*, LAG-3 comprises one or more mutations selected from R73E, R75A, R75E and R76E (Huard et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94(11): 5744-5749. In one embodiment, LAG-3 comprises the mutation R75E.

Preferential binding of the bispecific fusion protein to CTLA-4 over CD28 was attained using mutant CD80 (CD80w88a), which contains alanine instead of tryptophan at amino acid 88 (numbered in mouse CD80), as the ligand. CD80w88a binds CTLA-4 but exhibits minimal affinity for CD28 (Wu et al., (1997), *J. Exp. Med.* 185:1327-1335).

Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3), a natural ligand of MHCII, was selected as the other binding component of the bispecific fusion protein (Baixeras et al., (1992) *J. Exp. Med.* 176:327- 337; Triebel et al., (1990) *J. Exp. Med.* 171:1393-1405). We show that a fusion protein with such bi-functionality effectively inhibits T cell activation and stimulates anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β production. More importantly, this bispecific fusion protein also directed T cell differentiation into highly suppressive Foxp3⁺ Tregs. This did not occur when the well-established co-stimulatory inhibitor CTLA-4Ig was used instead (Bluestone et al., (2006) *Immunity* 24:233-238; Linsley and Nadler (2009) *Immunol. Rev.* 229:307-321).

Therefore, early engagement of CTLA-4 and crosslinking of CTLA-4 to the TCR during T cell activation could actively influence T cell differentiation. Such bispecific fusion proteins might thus represent a novel class of biologics that could be used to control excessive T cell responses in autoimmune diseases.

In a second aspect of the invention, there is provided the use of a bispecific biologic comprising a ligand specific for CTLA-4 and a ligand specific for a pMHC complex according to the first aspect of the invention, for the tolerisation of a T-cell by contacting said T-cell with an antigen-presenting cell which is presenting a peptide derived from said antigen complexed to a MHC molecule and said bispecific biologic.

In a third aspect, there is provided the use of a bispecific biologic comprising a ligand specific for CTLA-4 and a ligand specific for a pMHC complex according to the first aspect of the invention, in the treatment of a disease selected from an autoimmune disease and transplant rejection.

For example, the autoimmune disease is type 1 diabetes (T1D, Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Rheumatoid Arthritis (RA) and inflammatory bowel disease (IBD) (including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD)), multiple sclerosis (MS), scleroderma, and other diseases and disorders, such as PV (pemphigus vulgaris), psoriasis, atopic dermatitis, celiac disease, Chronic Obstructive Lung

disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease (thyroid), Sjogren's syndrome, Guillain-Barre syndrome, Goodpasture's syndrome, Addison's disease, Wegener's granulomatosis, primary biliary sclerosis, sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis, polymyalgia rheumatica. Raynaud's phenomenon, temporal arteritis, giant cell arteritis, autoimmune hemolytic anemia, pernicious anemia, polyarteritis nodosa. Behcet's disease, primary biliary cirrhosis, uveitis, myocarditis, rheumatic fever, ankylosing spondylitis, glomerulonephritis, sarcoidosis, dermatomyositis, myasthenia gravis, polymyositis, alopecia areata, and vitiligo.

In a fourth aspect, there is provided a method of tolerising a T-cell to an antigen, comprising contacting said T-cell with an antigen-presenting cell which is presenting a peptide derived from said antigen complexed to a MHC molecule and a bispecific biologic according to the first aspect of the invention.

In a fifth aspect, there is provided a method for treating a subject suffering from a condition selected from an autoimmune disease and transplant rejection, comprising the steps of administering to a subject in need thereof a bispecific biologic comprising a ligand specific for CTLA-4 and a ligand specific for a pMHC complex according to the first aspect of the invention.

For example, the autoimmune disease is Type 1 diabetes (T1D).

Description of the Figures

Figure 1. Designs of BsB and BsBA. (A) Schematic drawings of the BsB (bispecific biologics) and BsBA fusion proteins. (B) Schematic drawing of pMHCII, the TCR and co-stimulatory molecules in the immune synapse, as well as the proposed scheme for BsB-mediated crosslinking of CTLA-4 to the TCR via the CTLA-4/MHC II/TCR tri-molecular complex. The fusion protein engages CTLA-4 and indirectly ligates the TCR via binding to MHCII in the immune synapse. The two solid sides of the triangle denote crosslinking of MHCII and CTLA-4 as well as MHCII and TCR; the dashed side depicts ligation of CTLA-4 to TCR. The dotted line indicates inhibition of TCR signaling by BsB-engaged CTLA-4. C. Schematic drawing showing that the action of BsBA is similar to that of BsB except, it is unable to ligate the TCR.

Figure 2. Inhibition of allogenic T cell activation by BsB in a mixed lymphocyte reaction. Naïve T cells from C57BL/6 mice and LPS-treated and irradiated BALB/c APCs were mixed with the test constructs for 2 days. Culture media were then

harvested and assayed for IL-2. Only BsB and CTLA-4Ig inhibited T cell activation, as indicated by a decreased amount of IL-2 in the media. The figure is representative of more than five independent but similar studies.

Figure 3. Induction of Foxp3⁺ Tregs and IL-10 and TGF- β production by BsB.

- 5 (A) Allogenic mixed lymphocyte reactions were set up as described in the legend to Figure 2, using naïve CD4⁺CD62L^{hi}CD25⁻GFP⁺ cells that had been isolated from Foxp3-EGFP knock-in mice in the presence of the test constructs. Five days post-activation, CD4⁺ T cells were analyzed for GFP expression by flow cytometry. Tregs were gated as GFP⁺ and CD25⁺ cells. Only BsB treatment led to GFP expression, 10 indicating induction of Foxp3⁺ Tregs (middle left panel). Culture media were collected for cytokine analysis (right panels), which revealed elevated IL-10 and TGF- β levels in the presence of BsB. The data are representative of numerous independent but similar studies. (B) Requirement of autocrine TGF- β for Treg induction is indicated by the complete blockade of Treg induction in the presence of a 15 blocking antibody to TGF- β , whereas control Ab did not noticeably impact Treg induction.

Figure 4. BsB-mediated induction of antigen-specific Tregs *in vitro*. (A) *In vitro*

- induction of Ova₂₃₃₋₃₃₉-specific Tregs. Naïve OT-II T cells were mixed with LPS-activated and irradiated syngeneic APC in the presence of 0.5 μ g/ml Ova₂₃₃₋₂₃₉ 20 peptide. Control mIgG2a, BsB, and BsB plus an anti-TGF- β antibody (α TGF- β) were then added and tested as indicated (left panels). Cells were cultured for 5 days and then labeled with anti-CD25 and anti-Foxp3 antibodies before being analyzed by flow cytometry. IL-2, IL-10 and TGF- β levels in the culture media were assayed by ELISA (right panels). (B) Monitoring of induced Tregs proliferation. Studies were conducted 25 as in A except naïve OT-II T cells were pre-labeled with CFSE before being mixed with APCs. Cells were gated on Foxp3 and CFSE fluorescent channels.

Figure 5. Suppressive function of BsB-induced Tregs. (A) BsB- or TGF- β -induced

- Tregs were purified by flow cytometry and mixed with CFSE-labeled naïve responder T cells prepared from C57BL/6 mice at the indicated ratios in transwells (filled 30 columns) or regular culture wells (hatched columns). LPS-treated allogenic BALB/c APCs were added to stimulate T cell activation. The results (mean + standard deviation) indicate the percentage of proliferating responder T cells (Tresp), based on a CFSE dilution without Tregs (Tresp + APC only) set to 100%. (B) Anti-IL-10 and

anti-TGF- β antibodies were added to cells in regular culture wells at a Tresp:Treg ratio of 1:1 to determine the cytokines' contribution to T cell proliferation. The anti-TGF- β antibody partially inhibited the suppressive function of TGF- β -induced Tregs (left panel) but did not affect BsB-induced Tregs (right panel). The figure is
5 representative of more than three independent but similar studies.

Figure 6. Down-regulation of AKT and mTOR phosphorylation by BsB. Naïve T cells were cultured in round-bottom 96-well plates co-coated with anti-CD3, anti-CD28 and BsB, mouse IgG (mIgG) or mouse PD-L1 (mPD-L1) for 18 h. Cells deemed not activated were cultured in wells coated with IgG only. The
10 phosphorylation status of AKT and mTOR was then monitored by flow cytometry after staining with fluorescently labeled antibodies to phosphorylated AKT and mTOR. MFI denotes mean fluorescent intensity. This figure represents one of three independent experiments.

Figure 7. Sustained Foxp3 expression in Tregs in response to continuous stimulation with BsB. Round-bottom 96-well plates were co-coated with anti-CD3, anti-CD28 and BsB or mouse IgG. Naïve T cells from Foxp3-EGFP knock-in mice were cultured for 5 days to induce Tregs (left panels), which were then purified from the BsB-treated cells (red square) and re-stimulated in another round of culture in co-coated wells, as above, for 5 days, before analysis by flow cytometry for GFP⁺ cells.
15 Re-culturing of purified Tregs with the mouse IgG control for 5 days resulted in a loss of Foxp3⁺ expression in ~60% of cells (upper right quadrant of upper right panel), whereas less than 7% of the Tregs re-cultured with BsB had lost Foxp3⁺ expression (upper right quadrant of bottom right panel). This figure represents one of three independent experiments.

Figure 8. Pharmacokinetics of BsB in vivo and biochemical analysis. (A) Pharmacokinetic profile of BsB in mice. Normal C57BL/6 mice (n=5) were dosed intraperitoneally with 20 mg/kg of BsB. Blood samples were collected at the different time points indicated and the levels of BsB levels determined using an ELISA. (B) Comparison of the binding of BsB and mouse IgG2a to FcRn. FcRn were
25 immobilized to a Biacore chip. BsB or control mouse IgG2a was loaded onto the chip
30 at various concentrations and the signals then recorded.

Figure 9. Analysis of asparagine-linked glycosylation on BsB. The amino acid sequence of BsB was submitted to the NetNGlyc 1.0 Server for prediction of Asn-linked glycosylation sites. A total of 10 Asn-linked glycosylation sites (denoted N) were predicted; other amino acids are presented as dots. Monosaccharide composition of BsB was also performed to determine the composition of the glycans fucose (Fuc),
 5 , N-acetylglucosamine (GlcNAc), galactose (Gal), , mannose (Man), sialic acid (N-acetylneuramic acid). A sialic acid:galactose ratio of 0.68 indicates that about a third of the galactose residues are available for binding to the asialoglycoprotein receptor.

Figure 10. Treatment of non-diabetic (NOD) mice with BsB delayed the onset of type 1 diabetes (T1D) in a late prevention treatment paradigm. (A) Levels of
 10 Foxp3⁺ Tregs in the blood of BsB-treated NOD (closed circles, n=15) and saline-treated control NOD mice (closed triangles, n=14). There was a moderate but significant increase in the number of Tregs in the BsB-treated animals over that noted in the control animals. (B) Cumulative incidences of overt diabetes in NOD animals
 15 treated with BsB (filled circles) or saline (filled triangles).

Figure 11. Treatment of NOD mice with BsB delayed the onset of T1D in an early prevention treatment paradigm. (A) Levels of Foxp3⁺ Tregs in the blood of mice treated with BsB (closed circles, n=10), saline (closed triangles, n=10), CTLA-4Ig (closed squares, n=10) and mouse IgG2a (open squares, n=10). No increase in the
 20 number of Foxp3⁺ Tregs was detected after two weeks of treatment with BsB when compared to saline or mIgG2a-treated controls. However, treatment with CTLA-4Ig resulted in a statistically significant decrease in the number of Foxp3⁺ Tregs in the blood. (B) Cumulative incidences of overt diabetes in animals treated with BsB or controls. BsB treatment resulted in a significant delay in the onset of T1D when
 25 compared to the saline or mouse IgG2a-treated control groups before 24 weeks of age ($p=0.04$). However, no significant difference between the groups was noted at the end of the study. Data represent one of two separate studies with similar results, with total of 26 NOD mice in each group.

Figure 12. Longer-term treatment of NOD mice with BsB significantly delayed the onset of T1D in NOD mice. (A) Cumulative incidences of overt diabetes in BsB-
 30 treated (n=16) and untreated mice (n=16). BsB treatment significantly reduced the incidence of T1D when compared to those treated with saline ($p<0.01$). (B) Histopathological analysis of pancreatic tissues from animals treated with saline or

24

BsB. Panels a-c represent sections from saline-treated mice that remained non-diabetic with H&E, an antibody to insulin, or anti-CD3 and forkhead box P3 (Foxp3), respectively. Similar observations were noted in BsB-treated NOD mice that remained disease-free. No evidence of infiltration or insulitis was noted in any of the sections; a few Foxp3⁺ Tregs may be present (arrows in panel c). Panels d-f represent pancreatic sections from diabetic NOD animals. Invasive insulitis was clearly evident and insulin-producing β -cells were completely destroyed (e). Some CD3⁺ T cell infiltrations were also detected, along with few Tregs and many non-T cell leukocytes with blue nuclei (f). Panels g-i shows islets of BsB treated animals that remained non-diabetic exhibited characteristic peri-insulitis. Leukocyte infiltrations were noted but that were restricted to the periphery of the islets. Moreover, there was no notable destruction of the insulin-producing β -cells. Most of the leukocytes at the periphery were non-T cells (blue nuclei). Enlarged inset (panel j, represents red square in i) indicated Foxp3⁺ Tregs (yellow arrow head) were intermixed with other CD3⁺ T cells and non-T cell leukocytes (blue nuclei) at the periphery of islets. Images were acquired with a 40x objective; the inset was acquired with a 60x objective, which was then further enlarged 3x digitally.

Detailed Description of the Invention

Unless otherwise stated, all technical and scientific terms used herein have the same meanings as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Any methods and materials with similar or equivalent function to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention. Methods, devices, and materials suitable for such uses are now described. All publications cited herein are incorporated herein by reference in their entirety for the purpose of describing and disclosing the methodologies, reagents, and tools reported in the publications that might be used in connection with the invention.

The methods and techniques of the present application are generally performed according to conventional methods well known to those of skill in the art and as described in various general and more specific references that are cited and discussed throughout the present specification unless otherwise indicated. Such techniques are explained fully in the literature. *See, e.g.*, Gennaro, A. R., ed. (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co.; Hardman, J. G., Limbird, L. E., and Gilman, A. G., eds. (2001) The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th

ed., McGraw-Hill Co.; Colowick, S. et al., eds., Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; Weir, D. M. , and Blackwell, C. C., eds. (1986) Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, Blackwell Scientific Publications; Maniatis, T. et al., eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al., eds. (1999) Short
5 Protocols in Molecular Biology, 4th edition, John Wiley & Sons; Ream et al., eds. (1998) Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press; Newton, C. R., and Graham, A., eds. (1997) PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed., Springer-Verlag.

10 The term “antibody”, unless indicated otherwise, is used to refer to entire antibodies as well as antigen-binding fragments of such antibodies. *For example*, the term encompasses four-chain IgG molecules, as well as antibody fragments.

As used herein, the term “antibody fragments” refers to portions of an intact full length antibody - such as an antigen binding or variable region of the intact antibody.

15 Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules (e.g., scFv); multispecific antibody fragments such as bispecific, trispecific, and multispecific antibodies (e.g., diabodies, triabodies, tetrabodies); binding-domain immunoglobulin fusion proteins; camelized antibodies; minibodies; chelating recombinant antibodies;
20 tribodies or bibodies; intrabodies; nanobodies; small modular immunopharmaceuticals (SMIP), V_{HH} containing antibodies; and any other polypeptides formed from antibody fragments, *for example* as further described below.

Antibodies may be of any class, such as IgG, IgA, or IgM; and of any subclass, such
25 as IgG1 or IgG4. Different classes and subclasses of immunoglobulin have different properties, which may be advantageous in different applications.

Specificity, in the context of the present invention, requires that the claimed antibody be capable of selectively binding its defined cognate antigen, which is either CTLA-4 or the pMHC complex.

30 Naturally occurring immunoglobulins have a common core structure in which two identical light chains (about 24 kD) and two identical heavy chains (about 55 or 70 kD) form a tetramer. The amino-terminal portion of each chain is known as the

variable (V) region and can be distinguished from the more conserved constant (C) regions of the remainder of each chain. Within the variable region of the light chain (also called the V_L domain) is a C-terminal portion known as the J region. Within the variable region of the heavy chain (also called the V_H domain), there is a D region in addition to the J region. Most of the amino acid sequence variation in immunoglobulins is confined to three separate locations in the V regions known as hypervariable regions or complementarity determining regions (CDRs) which are directly involved in antigen binding. Proceeding from the amino-terminus, these regions are designated CDR1, CDR2 and CDR3, respectively. The CDRs are held in place by more conserved framework regions (FRs). Proceeding from the amino-terminus, these regions are designated FR1, FR2, FR3 and FR4, respectively. The locations of CDR and FR regions and a numbering system have been defined by Kabat et al. (Kabat, E.A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, and updates thereof which may be found online.

A humanized monoclonal antibody, as referred to herein, is an antibody which is composed of a human antibody framework, into which have been grafted CDRs from a non-human antibody. Procedures for the design and production of humanized antibodies are well known in the art, and have been described, *for example*, in Cabilly et al., U.S. Patent No. 4,816,567; Cabilly et al., European Patent Application 0 125 023; Boss et al., U.S. Patent No. 4,816,397; Boss et al., European Patent Application 0 120 694; Neuberger, M.S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M.S. et al., European Patent Application 0 194 276 B1; Winter, U.S. Patent No. 5,225,539; Winter, European Patent Application 0 239 400; Padlan, E.A. et al., European Patent Application 0 519 596. Further details on antibodies, humanized antibodies, human engineered antibodies, and methods for their preparation can be found in Kontermann, R. and Dübel, S. eds. (2001, 2010) *Antibody Engineering*, 2nd ed., Springer-Verlag, New York, NY, 2001.

Constant regions may be derived from any human antibody constant regions. Typically, variable region genes are cloned into expression vectors in frame with constant region genes to express heavy and light immunoglobulin chains. Such expression vectors can be transfected into antibody producing host cells for antibody synthesis.

Required antibody variable and constant regions may be derived from sequence databases. *For example*, immunoglobulin sequences are available in the IMGT/LIGM database (Giudicelli et al., (2006) *Nucleic Acids Res.* 34:(suppl. 1):D781-D784) or VBase (vbase.mrccpe.cam.ac.uk).

- 5 “Nucleic acids” as referred to herein typically include DNA molecules which encode the antibodies of the invention. Preferred are expression vectors, which are suitable for expressing the antibody genes in a host cell. Expression vectors and host cells for antibody gene expression are known in the art; see, *for example*, Morrow, K.J. (2008) *Genetic Engineering & Biotechnology News*. (June 15, 2008) 28(12), and Backliwal, G., et al. (2008) *Nucleic Acids Res.* 36(15): e96-e96.

- 10 “CD80”, as used herein, refers to mammalian CD80 antigen as well as to mutants thereof which have increased binding avidity or specificity for CTLA-4. *See* Linsley et al., (1994) *Immunity* 1:793-801, and Wu et al., (1997) *J. Exp. Med.* 185(7):1327-1335, incorporated herein by reference. Mammalian CD80 can be selected from rodent, such as mouse, or human CD80.

- 15 “CD86”, as used herein, refers to mammalian CD86 antigen as well as to mutants thereof which have increased binding avidity or specificity for CTLA-4. *See* Linsley et al., (1994) *Immunity* 1:793-801, incorporated herein by reference. Mammalian CD86 can be selected from rodent, such as mouse, or human CD86.

- 20 “CTLA-4”, as used herein, refers to mammalian cytotoxic lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4). The sequence of human CTLA-4 can be found in GenBank, Accession number AAH74893.1, GI:49904741. Mammalian CTLA-4 can be selected from rodent, such as mouse, or human CTLA-4.

- 25 “LAG-3”, as used herein, refers to mammalian lymphocyte activation antigen 3 (LAG-3). The sequence for human LAG-3 can be found in Huard et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 94:5744-5749, incorporated herein by reference. Mammalian LAG-3 can be selected from rodent, such as mouse, or human LAG-3.

- 30 The “MHC” is the complex involved in the presentation of antigen derived peptides by antigen-presenting cells, which is recognised by the TCR. In a certain aspect, the MHC is MHCII, which presents antigen to CD4⁺ helper T-cells. *See, for example*, Wucherpfennig et al., *CSH Perspect. Biol.* 2(4): a005140, epub 2010 Mar 17.

A bispecific biologic, which may be referred to as a bispecific ligand, is a ligand which is capable of binding, or being bound by, two targets contemporaneously. Bispecific antibodies are known in the art, and are further described below. In the context of the present invention, the two targets are the CTLA-4 molecule on a T-cell and the MHC peptide complex on an APC. The bispecific biologic according to the invention can cross-link the two targets; by virtue of the pMHC binding to the TCR in the immune synapse, it therefore cross-links the CTLA-4 molecule to the TCR. A “biologic”, in general, is a biological therapeutic or agent, which may be useful for, *inter alia*, therapeutic, diagnostic and/or research purposes.

A linker is any amino acid sequence which joins and separates two polypeptide domains in a protein. In the context of the bispecific ligand of the invention, the linker is the sequence which joins the CTLA-4 ligand to the MHC ligand. Exemplary linkers are sequences of amino acid, such as polyglycine, *for example* Gly-9. An alternative linker is an antibody Fc region. Such a linker spaces the two ligand domains by approximately 120Å.

A ligand according to the invention may comprise antibody and non-antibody ligands in any combination. *For example*, the CTLA-4 ligand may be an anti-CTLA-4 antibody, and the MHC ligand may be LAG-3. Alternatively, CD80 may be used as the CTLA-4 ligand, in combination with LAG-3 or an anti-MHC antibody. Both ligands may be antibodies, or both may be the natural ligands, CD80 and LAG-3.

Cytotoxic Lymphocyte-associated Antigen-4 (CTLA-4)

Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4), also known as CD152, is a negative regulator of the T cell response, which plays an important role in the maintenance of T cell homeostasis and in the induction of self-tolerance (Karandikar et al., (1996) *J Exp Med* 184:783-788; Krummel and Allison, (1995) *J Exp Med* 182:459-465; Linsley and Golstein, (1996) *Curr Biol* 6:398-400; Walunas and Bluestone, (1998) *J Immunol* 160:3855-3860; Walunas et al., (1994) *J Immunol* 160:3855-3860). Mice deficient in CTLA-4 develop multi-organ autoimmune disease and typically succumb to the ailment by 4 weeks of age (Tivol et al., (1995) *Immunity* 3:541-547; Waterhouse et al., (1995) *Science* 270:985-988). The molecular mechanisms through which CTLA-4 modulate T cell activity are multifaceted and are thought to occur either intrinsically on conventional T cells or extrinsically through

regulatory T cells (Tregs) (Ise et al., (2010) *Nat Immunol* 11:129-135; Jain et al., (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1524-1528; Paterson and Sharpe, (2010) *Nat Immunol* 11:109-111).

These mechanisms include competing with CD28 for ligand binding (Linsley et al., (1994) *Immunity* 1:793-801), inducing the production of the tolerogenic enzyme indoleamine 2,3 dioxygenase in APC (Grohmann et al., (2002) *Nat Immunol* 3:1097-1101; Onodera et al., (2009) *J Immunol* 183:5608-5614), and displacing CD28 from the immunological synapse (Pentcheva-Hoang et al., (2004) *Immunity* 21:401-413). CTLA-4 is homologous to the co-stimulatory molecule CD28 and shares the same
 10 ligands, CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2), which are expressed on the surface of antigen presenting cells (APCs). However, differential binding of CD80/CD86 on APCs to CD28 and CTLA-4 on effector T cells leads to opposing outcomes, with CD28 triggering T cell activation and CTLA-4 causing T cell inhibition. Engagement of CTLA-4 by its ligands (CD80/86) on APC also stimulates the recruitment of the
 15 phosphatases SHP-1 (Guntermann and Alexander, (2002) *J Immunol* 168:4420-4429) and PP2A (Baroja et al., (2002) *J Immunol* 168:5070-5078; Chuang et al., (2000) *Immunity* 13:313-322) to the vicinity of the TCR of T cells undergoing activation. Consequent dephosphorylation of key signaling molecules associated with the TCR results in termination of T cell activation (Griffin et al., (2000) *J Immunol* 164:4433-
 20 4442). Moreover, interventions that promote early engagement of CTLA-4 with its ligands and crosslinking to the TCR result in premature dampening of key signaling signatures and consequent inhibition of T cell activation, leading to T cell hyporesponsiveness or anergy (Blair et al., (1998) *Immunol* 160:12-15; Griffin et al., (2000) *J Immunol* 164:4433-4442; Krummel and Allison, (1996) *J Exp Med* 182:459-
 25 465; Walunas et al., (1996) *J Exp Med* 183:2541-2550).

To promote crosslinking of CTLA-4 to the TCR during the early phase of T cell activation a bispecific fusion protein (designated as "BsB") comprising a mutant CD80 (CD80w88a) and lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) was generated. BsB was designed to concurrently engage CTLA-4 and MHCII in the immune synapse and
 30 thereby indirectly crosslink it to the TCR via the cognate pairing of MHCII with the TCR (Karman et al., (2012) *J Biol Chem* epub 2012 Feb 15). In an allogenic MLR, BsB was shown to be effective at inhibiting T cell activation. Surprisingly, BsB also induced the production of IL-10 and TGF- β and promoted the differentiation of T

cells undergoing activation to Tregs. IL-10 can exert broad immune suppressive properties through its ability to control the activation of macrophages and dendritic cells (DCs), as well as self-regulate Th1 cells (Ohata et al., (2007) *Arthritis Rheum* 56:2947-2956). TGF- β can act as an inhibitor of T cell differentiation (Kehrl et al., (1986) *J Exp Med* 163:1037-1050), macrophage activation (Tsunawaki et al., (1988) *Nature* 334:260-262; Wahl et al., (1990) *Ann N Y Acad Sci* 593:188-196) and dendritic cell maturation (Steinman et al., (2003) *Annu Rev Immunol* 21:685-711). In addition to their anti-inflammatory functions, IL-10 and TGF- β also purportedly can influence Treg function. For example, IL-10 has been shown to induce IL-10 producing Tr1 cells (Roncarolo et al., (2006) *Immunol Rev* 212:28-50) and to act on Foxp3⁺ Tregs to maintain expression of Foxp3 and thereby propagate their suppressive function (Murai et al., (2009) *Nat Immunol* 10:1178-1184). Similarly, TGF- β has been reported to be necessary for the induction of Tregs (Chen et al., (2003) *J Exp Med* 198:1875-1886; Zheng et al., (2002) *J Immunol* 169:4183-4189) and in maintaining their suppressive function by promoting Foxp3 expression (Marie et al., (2005) *J Exp Med* 201:1061-1067).

Regulatory T cells (Tregs)

Tregs are a functionally distinct subpopulation of T cells capable of controlling the immune responses to self and non-self antigens. A deficiency of Tregs results in a heightened immune response and presentation of autoimmune diseases (Sakaguchi et al., (1995) *J Immunol* 155:1151-1164). Extensive research has established a role of these specialized T cells in controlling all aspects of immune responses, in particular in engendering self-tolerance. Without being bound to a particular theory, these findings indicate that agents capable of boosting the in situ production of Tregs or the adoptive transfer of Tregs may be deployed to treat autoimmune diseases. Indeed, Treg cell-based therapies using freshly isolated or ex vivo expanded Tregs have been shown to be effective in treating animal models of type 1 diabetes (T1D) (Tang et al., (2004) *J Exp Med* 199:1455-1465; Tarbell et al., (2007) *J Exp Med* 204:191-201) and graft-versus-host disease (Anderson et al., (2004) ; Taylor et al., (2002) *Blood* 99:3493-3499; Zhao et al., (2008) *Blood* 112:2129-2138). In lieu of isolating and expanding Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ Tregs (often designated as natural Tregs or nTregs) from peripheral blood or lymph nodes, Tregs can be induced from naïve CD4⁺CD25⁻ T cells in the context of TCR activation and in the concomitant presence of TGF- β .

These Tregs are often referred to as adaptive Tregs (aTregs) or induced Tregs (iTregs). They are also Foxp3⁺ and purportedly exhibit equally potent suppressive functions as nTregs (Chen et al., (2003) *J Exp Med* 198:1875-1886; Yamagiwa et al., (2001) *J Immunol* 166:7282-7289; Zheng et al., (2002) *J Immunol* 169:4183-4189).

5

Adoptive transfers of aTregs or iTregs have been shown to be effective in conferring protection against autoimmune disease in an animal model of collagen-induced arthritis (Gonzalez-Rey et al., (2006) *Arthritis Rheum* 54:864-876). However, it is becoming more evident that antigen-specific Tregs offer a significantly higher therapeutic quotient than polyclonal Tregs with a pan-TCR repertoire (Masteller et al.,

10

(2005) *J Immunol* 175:3053-3059; Tang et al., (2004) *J Exp Med* 199:1455-1465; Tarbell et al., (2007) *J Exp Med* 204:191-201), with less potential side effect on pan-immune suppression. For this reason, we sought to evaluate the relative merits of BsB at producing antigen-specific Tregs in an antigen-specific T cell activation setting *in vitro*. Moreover, we tested its potential in treating autoimmune diabetes in

15

the non-obese diabetic (NOD) mouse.

Type 1 Diabetes

Type 1 Diabetes (T1D) is an autoimmune disease caused by tissue specific destruction of insulin-producing pancreatic β -cells with consequent development of hyperglycemia. Non-obese diabetic (NOD) mice (female mice in particular)

20

spontaneously develop autoreactive T cells towards islet-specific self-antigens (e.g. insulin and glutamic acid decarboxylase 65). In concert with other lymphocytes, these autoreactive T cells initiate the development of peri-insulitis between 3 and 4 weeks of age followed by invasive insulitis at 9 weeks and spontaneous overt diabetes between 12 and 35 weeks (Anderson and Bluestone, (2005) *Annu Rev Immunol*

25

23:447-485). NOD mice share many similarities to the disease in human subjects such as the production of pancreas-specific autoantibodies and activation of autoreactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Susceptibility of these mice to autoimmunity, as in humans, is influenced by genes for the major histocompatibility complex (MHC), CTLA-4, and LAG-3. NOD mice harbor a unique major histocompatibility complex

30

(MHC) haplotype (H-2^{g7}), which reportedly confers the highest risk for disease susceptibility (McDevitt et al., (1996) *Hormone and metabolic research* 28:287-288; Wicker et al., (1995) *Annu Rev Immunol* 13:179-200). CTLA-4 polymorphism has also been noted in NOD mice (Ueda et al., (2003) *Nature* 423:506-511) and in

humans (Qu et al., (2009) *Genes and immunity* 10 Suppl 1:S27-32) and a deficiency of LAG-3 on the NOD background accelerates T1D onset with 100% penetrance (Bettini et al., (2011) *J Immunol* 187:3493-3498). Because BsB engages all these targets, the therapeutic merits of BsB were tested in this murine model of T1D.

5 **Antibodies**

The invention encompasses antigen-binding fragments of the antibodies set forth in the claims. As used herein, the term “fragments” refers to portions of the intact full length antibody - such as an antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments are set forth above.

- 10 The term “fragments” as used herein refers to fragments capable of binding the targets specified, the CTLA-4 molecule or the pMHC complex. These fragments may lack the Fc fragment of an intact antibody, clear more rapidly from the circulation, and can have less nonspecific tissue binding than an intact antibody. These fragments can be produced from intact antibodies using well known methods, *for example by*
- 15 proteolytic cleavage with enzymes such as papain (to produce Fab fragments) or pepsin (to produce F(ab')₂ fragments), or expression of such fragments by recombinant technology.

- The antibodies and fragments also encompass single-chain antibody fragments (scFv) that bind to the CTLA-4 molecule or the pMHC complex. An scFv comprises an
- 20 antibody heavy chain variable region (V_H) operably linked to an antibody light chain variable region (V_L) wherein the heavy chain variable region and the light chain variable region, together or individually, form a binding site that binds CTLA-4 molecule or the pMHC complex. An scFv may comprise a V_H region at the amino-terminal end and a V_L region at the carboxy-terminal end. Alternatively, scFv may
 - 25 comprise a V_L region at the amino-terminal end and a V_H region at the carboxy-terminal end. Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv)).
 - 30 A scFv may optionally further comprise a polypeptide linker between the heavy chain variable region and the light chain variable region.

The antibodies and fragments also encompass domain antibody (dAb) fragments as described in Ward, E.S. *et al.* (1989) *Nature* 341:544-546 which consist of a V_H domain.

5 The antibodies and fragments also encompass heavy chain antibodies (HCAb). These antibodies can apparently form antigen-binding regions using only heavy chain variable region, in that these functional antibodies are dimers of heavy chains only (referred to as “heavy-chain antibodies” or “HCAs”). Accordingly, antibodies and fragments may be heavy chain antibodies (HCAb) that specifically bind to the CTLA-4 or pMHC targets.

10 The antibodies and fragments also encompass antibodies that are SMIPs or binding domain immunoglobulin fusion proteins specific for the CTLA-4 or pMHC targets. These constructs are single-chain polypeptides comprising antigen-binding domains fused to immunoglobulin domains necessary to carry out antibody effector functions (*see* WO 2005/017148).

15 The antibodies and fragments also encompass diabodies. These are bivalent antibodies in which V_H and V_L domains are expressed on a single polypeptide chain, but using a linker that is too short to allow for pairing between the two domains on the same chain. This forces the domains to pair with complementary domains of another chain and thereby creates two antigen-binding sites (*see, for example*, WO 93/11161).

20 Diabodies can be bispecific or monospecific.

The antibody or antibody fragment thereof according to the invention does not cross-react with any target other than the intended CTLA-4 or pMHC targets.

The antibodies and fragments thereof may themselves be bispecific. *For example*, bispecific antibodies may resemble single antibodies (or antibody fragments) but have
25 two different antigen binding sites (variable regions). Bispecific antibodies can be produced by various methods – such as chemical techniques, “polydoma” techniques or recombinant DNA techniques. Bispecific antibodies may have binding specificities for at least two different epitopes, *for example* one epitope on each of the CTLA-4 and pMHC targets.

30 Bispecific antibodies comprising complementary pairs of V_H and V_L regions are known in the art. These bispecific antibodies comprise two pairs of V_H and V_L, each V_HV_L pair binding to a single antigen or epitope. Such bispecific antibodies include

hybrid hybridomas (Milstein, C. and Cuello, A.C., (1983) *Nature* 305 (5934): 537-40), minibodies (Hu et al., (1996) *Cancer Res.* 56:3055-3061), diabodies (Holliger et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; WO 94/13804), chelating recombinant antibodies (CRAbs) (Neri et al., (1995) *J. Mol. Biol.* 246,367- 373),
 5 biscFv (e.g., Atwell et al., (1996) *Mol. Immunol.* 33:1301-1312), “knobs in holes” stabilised antibodies (Carter et al., (1997) *Protein Sci.* 6:781-788). In each case each antibody species comprises two antigen-binding sites, each fashioned by a complementary pair of V_H and V_L domains. Each antibody is thereby able to bind to two different antigens or epitopes at the same time, with the binding to each antigen
 10 or epitope mediated by a V_H and its complementary V_L domain.

Natural autoantibodies have been described that are polyreactive (Casali and Notkins (1989) *Ann. Rev. Immunol.* 7: 515-531), reacting with at least two (usually more) different antigens or epitopes that are not structurally related. It has also been shown that selections of random peptide repertoires using phage display technology on a
 15 monoclonal antibody will identify a range of peptide sequences that fit the antigen binding site. Some of the sequences are highly related, fitting a consensus sequence, whereas others are very different and have been termed mimotopes (Lane and Stephen (1993) *Current Opinion in Immunology* 5:268-271). It is therefore clear that the binding site of an antibody, comprising associated and complementary V_H and V_L
 20 domains, has the potential to bind to many different antigens from a large universe of known antigens.

WO 03/002609 (Domantis) describes the production of dual specific antibodies in which each V_HV_L pair possesses a dual specificity, i.e., is able to bind two epitopes on the same or different antigens. The conformation can be open or closed; in an open
 25 conformation, the two epitopes may be bound simultaneously, but in the closed conformation binding to the first epitope prevents or discourages binding to the second.

Non-immunoglobulin proteins with multiple binding specificities are known in nature; *for example*, a number of transcription factors bind both DNA and other
 30 protein molecules. However, methods for selecting binding peptides in the prior art only select peptides with single, not dual or multiple specificities.

Different research teams have previously tethered polypeptides with cysteine residues to a synthetic molecular structure (Kemp, D. S. and McNamara, P. E., (1985) *J. Org. Chem.* Timmerman, P. et al., (2005) *ChemBioChem.* 6(5):821-4). Meloen and co-workers had used tris(bromomethyl)benzene and related molecules for rapid and
5 quantitative cyclisation of multiple peptide loops onto synthetic scaffolds for structural mimicry of protein surfaces (Timmerman, P. et al., (2005) *ibid*). Methods for the generation of candidate drug compounds wherein said compounds are generated by linking cysteine containing polypeptides to a molecular scaffold as *for example* tris(bromomethyl)benzene are disclosed in WO 2004/077062 and WO
10 2006/078161. The selection of such molecules using display technology is described in WO 2009/098450. Dual specific embodiments are further described in WO 2010/089117.

The ligand, such as an antibody or fragment thereof, may be modified in order to increase its serum half-life, *for example*, by adding molecules - such as PEG or other
15 water soluble polymers, including polysaccharide polymers to increase the half-life. In one embodiment, an antibody Fc region may be added to the bispecific linker according to the invention, to increase circulating half-life.

Antibody production

Antibody production can be performed by any technique known in the art, including
20 in transgenic organisms such as goats (*see* Pollock et al. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147- 157), chickens (*see* Morrow, KJJ (2000) *Genet. Eng. News* 20:1 -55), mice (*see* Pollock et al. *ibid*) or plants (*see* Doran PM (2000) *Curr. Opinion Biotechnol.* 11:199-204; Ma, JK-C (1998) *Nat.Med.* 4:601-606; Baez, J. et al. (2000) *BioPharm.* 13:50-54; Stoger, E. et al. (2000) *Plant Mol. Biol.* 42:583-590). Antibodies
25 may also be produced by chemical synthesis; however expression of genes encoding the antibodies in host cells is preferred.

A polynucleotide encoding the antibody is isolated and inserted into a replicable construct or vector such as a plasmid for further propagation or expression in a host cell. Constructs or vectors (e.g., expression vectors) suitable for the expression of a
30 humanized immunoglobulin according to the invention are available in the art. A variety of vectors are available, including vectors which are maintained in single copy or multiple copies in a host cell, or which become integrated into the host cell's

chromosome(s). The constructs or vectors can be introduced into a suitable host cell, and cells which express a humanized immunoglobulin can be produced and maintained in culture. A single vector or multiple vectors can be used for the expression of a humanized immunoglobulin.

- 5 Polynucleotides encoding the antibody are readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., oligonucleotide probes). Vectors that may be used include plasmid, virus, phage, transposons, minichromosomes of which plasmids are a typical embodiment. Generally such vectors further include a signal sequence, origin of replication, one or more marker genes, an enhancer element, a promoter and
- 10 transcription termination sequences operably linked to the light and/or heavy chain polynucleotide so as to facilitate expression. Polynucleotides encoding the light and heavy chains may be inserted into separate vectors and introduced (e.g., by transformation, transfection, electroporation or transduction) into the same host cell concurrently or sequentially or, if desired both the heavy chain and light chain can be
- 15 inserted into the same vector prior to such introduction.

A promoter can be provided for expression in a suitable host cell. Promoters can be constitutive or inducible. *For example*, a promoter can be operably linked to a nucleic acid encoding a humanized immunoglobulin or immunoglobulin chain, such that it directs expression of the encoded polypeptide. A variety of suitable promoters for

- 20 prokaryotic and eukaryotic hosts are available. Prokaryotic promoters include lac, tac, T3, T7 promoters for *E. coli*; 3- phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes e.g., enolase, glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase, hexokinase, pyruvate decarboxylase, phosphofructokinase, glucose 6 phosphate isomerase, 3- phosphoglycerate mutase and glucokinase. Eukaryotic promoters include inducible
- 25 yeast promoters such as alcohol dehydrogenase 2, isocytochrome C, acid phosphatase, metallothionein and enzymes responsible for nitrogen metabolism or maltose/galactose utilization; RNA polymerase II promoters including viral promoters such as polyoma, fowlpox and adenoviruses (e.g., adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus (in particular the immediate early gene
- 30 promoter), retrovirus, hepatitis B virus, actin, rous sarcoma virus (RSV) promoter and the early or late Simian virus 40 and non-viral promoters such as EF-1 alpha (Mizushima and Nagata (1990) *Nucleic Acids Res.* 18(17):5322). Those of skill in the

art will be able to select the appropriate promoter for expressing a humanized antibody or portion thereof of the invention.

Where appropriate, e.g., for expression in cells of higher eukaryotes, additional enhancer elements can be included instead of or as well as those found located in the promoters described above. Suitable mammalian enhancer sequences include enhancer elements from globin, elastase, albumin, fetoprotein, metallothionein and insulin. Alternatively, one may use an enhancer element from a eukaryotic cell virus such as SV40 enhancer, cytomegalovirus early promoter enhancer, polyoma enhancer, baculoviral enhancer or murine IgG2a locus (*see* WO 04/009823). Whilst such enhancers are typically located on the vector at a site upstream to the promoter, they can also be located elsewhere e.g., within the untranslated region or downstream of the polyadenylation signal. The choice and positioning of enhancer may be based upon compatibility with the host cell used for expression.

In addition, the vectors (e.g., expression vectors) typically comprise a selectable marker for selection of host cells carrying the vector and, in the case of a replicable vector, an origin of replication. Genes encoding products which confer antibiotic or drug resistance are common selectable markers and may be used in prokaryotic (e.g., β -lactamase gene (ampicillin resistance), Tet gene (tetracycline resistance) and eukaryotic cells (e.g., neomycin (G418 or geneticin), gpt (mycophenolic acid), ampicillin, or hygromycin resistance genes). Dihydrofolate reductase marker genes permit selection with methotrexate in a variety of hosts. Genes encoding the gene product of auxotrophic markers of the host (e.g., *LEU2*, *URA3*, *HIS3*) are often used as selectable markers in yeast. Use of viral (e.g., baculovirus) or phage vectors, and vectors which are capable of integrating into the genome of the host cell, such as retroviral vectors, are also contemplated.

In eukaryotic systems, polyadenylation and termination signals are operably linked to polynucleotide encoding the antibody of this invention. Such signals are typically placed 3' of the open reading frame. In mammalian systems, non-limiting examples of polyadenylation/termination signals include those derived from growth hormones, elongation factor-1 alpha and viral (e.g., SV40) genes or retroviral long terminal repeats. In yeast systems, non-limiting examples of polyadenylation/termination signals include those derived from the phosphoglycerate kinase (PGK) and the alcohol dehydrogenase 1 (ADH) genes. In prokaryotic systems polyadenylation

signals are typically not required and it is instead usual to employ shorter and more defined terminator sequences. The choice of polyadenylation/termination sequences may be based upon compatibility with the host cell used for expression. In addition to the above, other features that can be employed to enhance yields include chromatin
 5 remodeling elements, introns and host-cell specific codon modification. The codon usage of the antibody of this invention thereof can be modified to accommodate codon bias of the host cell such to augment transcript and/or product yield (e.g., Hoekema, A. et al. (1987) *Mol Cell Biol.* 7(8):2914-24). The choice of codons may be based upon compatibility with the host cell used for expression.

- 10 The invention thus relates to isolated nucleic acid molecules that encode the humanized immunoglobulins, or heavy or light chains, thereof, of this invention. The invention also relates to isolated nucleic acid molecules that encode an antigen-binding portion of the immunoglobulins and their chains.

The antibodies according to this invention can be produced, *for example*, by the
 15 expression of one or more recombinant nucleic acids encoding the antibody in a suitable host cell. The host cell can be produced using any suitable method. *For example*, the expression constructs (e.g., one or more vectors, e.g., a mammalian cell expression vector) described herein can be introduced into a suitable host cell, and the resulting cell can be maintained (e.g., in culture, in an animal, in a plant) under
 20 conditions suitable for expression of the construct(s) or vector(s). Suitable host cells can be prokaryotic, including bacterial cells such as *E. coli* (e.g., strain DH5aTM (Invitrogen, Carlsbad, CA), PerC6 cells (Crucell, Leiden, NL), *B. subtilis* and/or other suitable bacteria; eukaryotic cells, such as fungal or yeast cells (e.g., *Pichia pastoris*, *Aspergillus sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora*
 25 *crassa*), or other lower eukaryotic cells, and cells of higher eukaryotes such as those from insects (e.g., *Drosophila* Schnieder S2 cells, Sf9 insect cells (WO 94/126087 (O'Connor), TN5BI-4 (HIGH FIVETM) insect cells (Invitrogen), mammals (e.g., COS cells, such as COS-I (ATCC Accession No. CRL-1650) and COS-7 (ATCC
 30 Accession No. CRL-1651), CHO (e.g., ATCC Accession No. CRL-9096), CHO DG44 (Urlaub, G. and Chasin, LA., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(7):4216-4220), 293 (ATCC Accession No. CRL-1573), HeLa (ATCC Accession No. CCL-2), CVI (ATCC Accession No. CCL-70), WOP (Dailey, L., et al., (1985) *J. Virol.*, 54:739-749), 3T3, 293T (Pear, W. S., et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.

90:8392-8396), NSO cells, SP2/0 cells, HuT 78 cells and the like, or plants (e.g., tobacco, lemna (duckweed), and algae). *See, for example*, Ausubel, F.M. *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons Inc. (1993). In some embodiments, the host cell is not part of a multicellular organism (e.g., plant or animal), e.g., it is an isolated host cell or is part of a cell culture.

Host cells may be cultured in spinner flasks, shake flasks, roller bottles, wave bioreactors (e.g., System 1000 from wavebiotech.com) or hollow fibre systems but it is preferred for large scale production that stirred tank bioreactors or bag bioreactors (e.g., Wave Biotech, Somerset, New Jersey USA) are used particularly for suspension cultures. Typically stirred tank bioreactors are adapted for aeration using e.g., spargers, baffles or low shear impellers. For bubble columns and airlift bioreactors, direct aeration with air or oxygen bubbles maybe used. Where the host cells are cultured in a serum free culture medium, the medium can be supplemented with a cell protective agent such as pluronic F-68 to help prevent cell damage as a result of the aeration process. Depending on the host cell characteristics, microcarriers maybe used as growth substrates for anchorage dependent cell lines, or the cells maybe adapted to suspension culture. The culturing of host cells, particularly vertebrate host cells, may utilize a variety of operational modes such as batch, fed-batch, repeated batch processing (*see* Drapeau et al (1994) *Cytotechnology* 15: 103-109), extended batch process or perfusion culture. Although recombinantly transformed mammalian host cells may be cultured in serum-containing media such media comprising fetal calf serum (FCS), it is preferred that such host cells are cultured in serum free media such as disclosed in Keen et al (1995) *Cytotechnology* 17:153-163, or commercially available media such as ProCHO-CDM or UltraCHO™ (Cambrex NJ, USA), supplemented where necessary with an energy source such as glucose and synthetic growth factors such as recombinant insulin. The serum-free culturing of host cells may require that those cells are adapted to grow in serum free conditions. One adaptation approach is to culture such host cells in serum containing media and repeatedly exchange 80% of the culture medium for the serum-free media so that the host cells learn to adapt in serum free conditions (*see e.g.*, Scharfenberg K. et al (1995) in *Animal Cell Technology Developments Towards the 21st Century* (Beuvery E.C. et al eds), pp619-623, Kluwer Academic publishers).

Antibodies according to the invention may be secreted into the medium and recovered and purified therefrom using a variety of techniques to provide a degree of purification suitable for the intended use. *For example*, the use of therapeutic antibodies of the invention for the treatment of human patients typically mandates at least 95% purity as determined by reducing SDS-PAGE, more typically 98% or 99% purity, when compared to the culture media comprising the therapeutic antibodies. In the first instance, cell debris from the culture media is typically removed using centrifugation followed by a clarification step of the supernatant using e.g., microfiltration, ultrafiltration and/or depth filtration. Alternatively, the antibody can be harvested by microfiltration, ultrafiltration or depth filtration without prior centrifugation. A variety of other techniques such as dialysis and gel electrophoresis and chromatographic techniques such as hydroxyapatite (HA), affinity chromatography (optionally involving an affinity tagging system such as polyhistidine) and/or hydrophobic interaction chromatography (HIC) (*see* US 5,429,746) are available. In one embodiment, the antibodies of the invention, following various clarification steps, are captured using Protein A or G affinity chromatography followed by further chromatography steps such as ion exchange and/or HA chromatography, anion or cation exchange, size exclusion chromatography and ammonium sulphate precipitation. Typically, various virus removal steps are also employed (e.g., nanofiltration using, e.g., a DV-20 filter). Following these various steps, a purified preparation comprising at least 10mg/ml or greater e.g., 100mg/ml or greater of the antibody of the invention is provided and therefore forms an embodiment of the invention. Concentration to 100mg/ml or greater can be generated by ultracentrifugation. Such preparations are substantially free of aggregated forms of antibodies of the invention.

Bacterial systems are particularly suited for the expression of antibody fragments. Such fragments are localized intracellularly or within the periplasm. Insoluble periplasmic proteins can be extracted and refolded to form active proteins according to methods known to those skilled in the art, *see* Sanchez et al. (1999) *J. Biotechnol.* 72:13-20; Cupit, PM et al. (1999) *Lett. Appl. Microbiol.* 29:273-277.

The present invention also relates to cells comprising a nucleic acid, e.g., a vector, of the invention (e.g., an expression vector). *For example*, a nucleic acid (i.e., one or more nucleic acids) encoding the heavy and light chains of a humanized

immunoglobulin according to the invention, or a construct (i.e., one or more constructs, e.g., one or more vectors) comprising such nucleic acid(s), can be introduced into a suitable host cell by a method appropriate to the host cell selected (e.g., transformation, transfection, electroporation, infection), with the nucleic acid(s) being, or becoming, operably linked to one or more expression control elements (e.g., in a vector, in a construct created by processes in the cell, integrated into the host cell genome). Host cells can be maintained under conditions suitable for expression (e.g., in the presence of inducer, suitable media supplemented with appropriate salts, growth factors, antibiotic, nutritional supplements, *etc.*), whereby the encoded polypeptide(s) are produced. If desired, the encoded humanised antibody can be isolated, *for example*, from the host cells, culture medium, or milk. This process encompasses expression in a host cell (e.g., a mammary gland cell) of a transgenic animal or plant (e.g., tobacco) (*see e.g.*, WO 92/03918).

CD80 Ligands

The design and construction of CD80 ligands is intended to maximise the specificity of the ligand for CTLA-4 over CD28. The sequence of CD80 is known in the art, cited example in Wu et al., 1997. CD80 comprises an extracellular Ig-V variable-like domain, and an intracellular IgC constant-like domain. In a preferred embodiment, the extracellular domain of CD80 is used as a ligand. *For example*, see SEQ ID NO: 15, especially residues 1-241.

Mutations can be made in human CD80 to improve binding affinity, and to improve selectivity for CTLA4 over CD28. *See, for example*, Wu et al., 1997.

Mutants other than W84A may be made, including K71G, K71V, S109G, R123S, R123D, G124L, S190A, S201A, R63A, M81A, N97A, E196A. See Peach et al., *JBC* 1995. 270(6): 21181-21187. Assessment of binding affinity of mutants for both CTLA-4 and CD28 can be effected by site-directed mutagenesis followed by expression of the mutant polypeptides, and determination of K_d by surface plasmon resonance using CTLA-4 and CD28 Biacore chips. *See, for example*. Guo et al., (1995) *J. Exp. Med.* 181:1345-55.

Mutants having advantageous binding and selectivity profiles can be selected, and further assessed in cell based assays. *For example*, flow cytometry can be used to assay the effect of wild-type or mutant CD80 transfected into the cells.

LAG-3 Ligands

LAG-3 has been described in the art, and the binding site to the MHCII protein characterised. *See* Huard et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(11):5744-9. LAG-3 has four extracellular Ig-like domains, and mutations can be introduced into these domains to optimise binding to MHCII.

The effectiveness of mutations can be analysed as described above in respect of CD80 ligands.

In one aspect, only domains 1 and 2 (D1 and D2) of the four Ig-like domains of LAG-3 are used in a ligand according to the invention. It is believed that these domains are responsible for interaction with the MHCII protein.

Bispecific Ligand Constructs

The construction of a bispecific ligand follows the general formula “ligand-linker-ligand”. Bispecific antibodies are known in the art, and are described above.

Construction of bispecific ligands preferably involved construction and expression of an appropriate gene encoding the desired polypeptide. Other methods of constructing by mixing the two polypeptides under conditions that permit covalent, ionic, or hydrophobic bonding. In preferred embodiments, it comprises covalently bonding the polypeptides. Where a bispecific molecule comprising three components is constructed, such as a CTLA-4 ligand, a linker and an MHC ligand, two of the three may be combined, bound together, and the third polypeptide subsequently added to the fusion product, and bound to create a fusion product comprising all three polypeptides.

Polypeptides in accordance with the present invention can be produced by any desired technique, including chemical synthesis, isolation from biological samples and expression of a nucleic acid encoding such a polypeptide. Nucleic acids, in their turn, can be synthesised or isolated from biological sources, and modified by site-directed mutagenesis if desired.

The invention thus relates to vectors encoding a bispecific ligand according to the invention, or a fragment thereof. The vector can be, *for example*, a phage, plasmid, viral, or retroviral vector.

Nucleic acids according to the invention can be part of a vector containing a selectable marker for propagation in a host. Generally, a plasmid vector is introduced in a precipitate, such as a calcium phosphate precipitate, or in a complex with a charged lipid.

- 5 If the vector is a virus, it can be packaged *in vitro* using an appropriate packaging cell line and then transduced into host cells.

The nucleic acid insert is operatively linked to an appropriate promoter, such as the phage lambda PL promoter, the *E. coli* lac, trp, phoA and tac promoters, the SV40 early and late promoters and promoters of retroviral LTRs. Other suitable promoters
10 are known to those skilled in the art. The expression constructs further contain sites for transcription initiation, termination, and, in the transcribed region, a ribosome binding site for translation. The coding portion of the transcripts expressed by the constructs preferably includes a translation initiating codon at the beginning and a termination codon (UAA, UGA or UAG) appropriately positioned at the end of the
15 polypeptide to be translated.

As indicated, the expression vectors preferably include at least one selectable marker. Such markers include dihydrofolate reductase, G418 or neomycin resistance for eukaryotic cell

culture and tetracycline, kanamycin or ampicillin resistance genes for culturing in *E. coli* and other bacteria. Representative examples of appropriate hosts include, but are
20 not limited to, bacterial cells, such as *E. coli*, *Streptomyces* and *Salmonella typhimurium* cells; fungal cells, such as yeast cells (e.g., *Saccharomyces cerevisiae* or *Pichia pastoris*); insect cells such as *Drosophila* S2 and *Spodoptera* Sf9 cells; animal cells such as CHO, COS, HEK293, and Bowes melanoma cells; and plant cells.

- 25 Appropriate culture media and conditions for the above-described host cells are known in the art and available commercially.

Among vectors preferred for use in bacteria include pQE70, pQE60 and pQE-9, available from QIAGEN, Inc.; pBluescript vectors, Phagescript vectors, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, available from Stratagene Cloning Systems, Inc.; and
30 ptrc99a, pKK2233, pKK233-3, pDR540, pRIT5 available from Pharmacia Biotech, Inc. Among preferred eukaryotic vectors are pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI and pSG available from Stratagene; and pSVK3, pBPV, pMSG and pSVL available from

Pharmacia. Among vectors preferred for use in mammalian cell expression include pSG5 Vector, pCMV*SPORT6, pcDNA, pCEP4, pREP4, pCI, pSI and pBICEP-CMV. Preferred expression vectors for use in yeast systems include, but are not limited to pYES2, pYDI, pTEFI/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, 5 pPIC9, pPIC3.5, pHILD2, pHIL-SI, pPIC3.5K, pPIC9K, and PA0815 (all available from Invitrogen, Carlsbad, CA).

Introduction of the construct into the host cell can be effected by calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, infection, or other methods. Such methods 10 are described in many standard laboratory manuals, such as Sambrook et al., referred to above. A polypeptide according to the invention can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulphate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction 15 chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography ("HPLC") is employed for purification.

Polypeptides according to the present invention can also be recovered from biological sources, including bodily fluids, tissues and cells, especially cells derived from 20 tumour tissue or suspected tumour tissues from a subject.

In addition, polypeptides according to the invention can be chemically synthesised using techniques known in the art (*for example, see* Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman & Co. , N. Y. , and Hunkapiller et al., (1984) *Nature*, 310:105-111). *For example*, a polypeptide comprising all or part 25 of a bispecific ligand according to the invention can be synthesised by use of a peptide synthesiser.

Bispecific ligands in accordance with the invention are described in detail in the SEQ IDs appended hereto. SEQ ID NOs: 1 and 2 provide the mouse surrogate DNA and protein sequences of bispecific ligands in which the CTLA-4 ligand CD80w88a is 30 paired with the MHC ligand LAG-3, separated by the IgG2a Fc region and a Gly-9 (G9) sequence. A terminal His tag (H6) sequence is provided at the C-terminus. SEQ ID NOs: 3 and 4 provide mouse surrogate DNA and protein sequences for the same

constructs as SEQ ID NOs: 1 and 2, except that the IgG2a Fc region is placed C-terminal to the LAG-3 polypeptide, such that the CD80 and LAG-3 peptides are separated by G9 alone. The two arrangements, with the Fc region between the ligands or C-terminal thereto, are referred to as gene 1 and gene 2 constructs, respectively.

5 SEQ ID NOs: 5 and 6 provide human DNA and protein sequences in which wild-type sequence has been preserved. No mutations are made, either to CD80 or LAG-3.

In SEQ ID NOs: 7 and 8, a W84A mutation has been made to human CD80 (the equivalent of W88A in mouse) and an R75E mutation has been made in LAG-3. The remaining SEQ IDs (NOs: 7- 14) describe other mutations in the CD80 and LAG-3
10 sequences.

Therapeutic Applications

Suppression of T cell activity is desirable in a number of situations in which immunosuppression is warranted, and/or an autoimmune condition occurs. Accordingly, targeting of the CTLA4/MHC interaction is indicated in the treatment of
15 diseases involving an inappropriate or undesired immune response, such as inflammation, autoimmunity, and conditions involving such mechanisms. In one embodiment, such disease or disorder is an autoimmune and/or inflammatory disease. Examples of such autoimmune and/or inflammatory diseases are set forth above.

In one embodiment, such disease or disorder is Type 1 Diabetes (T1D).

20 In another embodiment, the ligands according to the invention are used to aid transplantation by immunosuppressing the subject. Such use alleviates graft-versus-host disease. For a description of existing treatments for graft-versus-host disease, *see* Svehnilson, (2005) *Bone Marrow Transplantation* 35:S65–S67, and references cited therein. Advantageously, the antibodies of the invention may be used in combination
25 with other available therapies.

With regard to the treatment of autoimmune diseases, combination therapy may include administration of a ligand of the present invention together with a medicament, which together with the ligand comprise an effective amount for preventing or treating such autoimmune diseases. Where said autoimmune disease is
30 Type 1 diabetes, the combination therapy may encompass one or more of an agent that promotes the growth of pancreatic beta-cells or enhances beta-cell transplantation, such as beta cell growth or survival factors or immunomodulatory

antibodies. Where said autoimmune disease is rheumatoid arthritis, said combination therapy may encompass one or more of methotrexate, an anti-TNF- α antibody, a TNF- α receptor-Ig fusion protein, an anti-IL-6, or anti-IL17, or anti-IL-15 or anti-IL-21 antibody, a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), or a disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD). *For example*, the additional agent may be a biological agent such as an anti-TNF agent (e.g., Enbrel®, infliximab (Remicade® and adalimumab (Humira®) or rituximab (Rituxan®). Where said autoimmune disease is hematopoietic transplant rejection, hematopoietic growth factor(s) (*such as* erythropoietin, G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-11, thrombopoietin, *etc.*) or antimicrobial(s) (*such as* antibiotic, antiviral, antifungal drugs) may be administered. Where said autoimmune disease is psoriasis, the additional agent may be one or more of tar and derivatives thereof, phototherapy, corticosteroids, Cyclosporine A, vitamin D analogs, methotrexate, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitors, as well as biologic agents such as anti-TNF- α agents and Rituxan®. Where said autoimmune disease is an inflammatory bowel disease (IBD) *such as, for example*, Crohn's Disease or ulcerative colitis, the additional agent may be one or more of aminosalicylates, corticosteroids, immunomodulators, antibiotics, or biologic agents such as Remicade® and Humira®.

The combination treatment may be carried out in any way as deemed necessary or convenient by the person skilled in the art and for the purpose of this specification, no limitations with regard to the order, amount, repetition or relative amount of the compounds to be used in combination is contemplated. Accordingly, the antibodies according to the present invention for use in therapy may be formulated into pharmaceutical compositions. The present invention is also related to pharmaceutical compositions comprising peptides according to the present invention.

Pharmaceutical Compositions

In a preferred embodiment, there is provided a pharmaceutical composition comprising a bispecific ligand according to the invention, or a ligand or ligands identifiable by an assay method as defined in the previous aspect of the invention. Ligands may be immunoglobulins, peptides, nucleic acids or small molecules, as discussed herein. They are referred to, in the following discussion, as “compounds”.

- A pharmaceutical composition according to the invention is a composition of matter comprising a compound or compounds capable of modulating T-cell activity as an active ingredient. Typically, the compound is in the form of any pharmaceutically acceptable salt, or e.g., where appropriate, an analog, free base form, tautomer,
- 5 enantiomer racemate, or combination thereof. The active ingredients of a pharmaceutical composition comprising the active ingredient according to the invention are contemplated to exhibit excellent therapeutic activity, *for example*, in the treatment of graft-versus-host disease, when administered in amount which depends on the particular case.
- 10 In another embodiment, one or more compounds of the invention may be used in combination with any art recognized compound known to be suitable for treating the particular indication in treating any of the aforementioned conditions. Accordingly, one or more compounds of the invention may be combined with one or more art recognized compounds known to be suitable for treating the foregoing indications
- 15 such that a convenient, single composition can be administered to the subject. Dosage regimen may be adjusted to provide the optimum therapeutic response.
- For example*, several divided doses may be administered daily or the dose may be proportionally reduced as indicated by the exigencies of the therapeutic situation.
- The active ingredient may be administered in a convenient manner such as by the
- 20 oral, intravenous (where water soluble), intramuscular, subcutaneous, intranasal, intradermal or suppository routes or implanting (e.g., using slow release molecules).
- Depending on the route of administration, the active ingredient may be required to be coated in a material to protect said ingredients from the action of enzymes, acids and other natural conditions which may inactivate said ingredient.
- 25 In order to administer the active ingredient by other than parenteral administration, it will be coated by, or administered with, a material to prevent its inactivation. *For example*, the active ingredient may be administered in an adjuvant, co administered with enzyme inhibitors or in liposomes. Adjuvant is used in its broadest sense and includes any immune stimulating compound such as interferon. Adjuvants
- 30 contemplated herein include resorcinols, non-ionic surfactants such as polyoxyethylene oleyl ether and n-hexadecyl polyethylene ether. Enzyme inhibitors include pancreatic trypsin.

Liposomes include water-in-oil-in-water CGF emulsions as well as conventional liposomes.

The active ingredient may also be administered parenterally or intraperitoneally.

Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and
5 mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions (where water soluble) or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. In all cases the form must be
10 sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, *for example*, water, ethanol, polyol (*for example*, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, *and the like*),
15 suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, *for example*, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants.

The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, *for example*, parabens, chlorobutanol, phenol,
20 sorbic acid, thimerosal, and the like. In certain cases, it may be preferable to include isotonic agents, *for example*, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, *for example*, aluminium monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active ingredient in the
25 required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the sterilized active ingredient into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of
30 sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum drying and the freeze-drying technique which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from previously sterile-filtered solution thereof.

As used herein "pharmaceutically acceptable carrier and/or diluent" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any
5 conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, use thereof in the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions.

It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein
10 refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the mammalian subjects to be treated; each unit containing a predetermined quantity of active material calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the novel dosage unit forms of the invention are dictated by and directly dependent on (a) the unique characteristics of
15 the active material and the particular therapeutic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such as active material for the treatment of disease in living subjects having a diseased condition in which bodily health is impaired.

The principal active ingredients are compounded for convenient and effective
20 administration in effective amounts with a suitable pharmaceutically acceptable carrier in dosage unit form. In the case of compositions containing supplementary active ingredients, the dosages are determined by reference to the usual dose and manner of administration of the said ingredients.

In order to facilitate delivery of peptide compounds, including antibodies, to cells,
25 peptides may be modified in order to improve their ability to cross a cell membrane. *For example*, US 5,149,782 discloses the use of fusogenic peptides, ion-channel forming peptides, membrane peptides, long-chain fatty acids and other membrane blending agents to increase protein transport across the cell membrane. These and other methods are also described in WO 97/37016 and US 5,108,921, incorporated
30 herein by reference.

In a further aspect there is provided the active ingredient of the invention as hereinbefore defined for use in the treatment of disease either alone or in combination

52

with art recognized compounds known to be suitable for treating the particular indication. Consequently there is provided the use of an active ingredient of the invention for the manufacture of a medicament for the treatment of disease associated with an aberrant immune response.

- 5 Moreover, there is provided a method for treating a condition associated with an aberrant immune response, comprising administering to a subject a therapeutically effective amount of a ligand identifiable using an assay method as described above.

The invention is further described, for the purposes of illustration only, in the following examples.

10 **Examples**

Example 1

Design of a bispecific fusion protein that engages CTLA-4 and crosslinks it to the TCR via MHC 11.

- To generate a bispecific fusion protein that selectively and agonistically engages
- 15 CTLA-4 and simultaneously ligates it to the TCR, mutant CD80 (CD80w88a, referred to hereafter as CD80wa) that binds CTLA-4 but has minimal affinity for CD28 (Wu et al., 1997) was fused to LAG-3, a natural ligand of MHCII (Baixeras et al., 1992; Triebel et al., 1990). CD80wa was joined to LAG-3 using a linker composed of nine glycines, which in turn was attached to the Fc portion of mouse IgG2a to purportedly
- 20 increase its circulating half-life (Fig. 1A). In response to a ligand of this configuration, CTLA-4 engagement and ligation to the TCR were expected to occur indirectly, via formation of the tri-molecular complex (CTLA-4/MHCII/TCR) in the immune synapses during early T cell activation (Fig. 1B). Conceptually, outside of the context of the immune synapse, binding of the bispecific fusion protein to either
- 25 CTLA-4 or MHCII alone or to both CTLA-4 and MHCII should not lead to inhibition of T cell activity. The engagement of CTLA-4 by CD80wa was designed to trigger CTLA-4 signaling via the recruitment of phosphatases to the cytoplasmic tail of CTLA-4. Meanwhile, binding of LAG-3 to MHCII was intended to bring CTLA-4 into the proximity of the cognate TCR, which binds the pMHCII complex in the
- 30 immune synapse (Fig. 1B). The combination of these two binding events was expected to deliver an inhibitory signal to the TCR. A control fusion protein

comprising CD80wa and IgG2a Fc was also constructed (Fig. 1A), which should not be capable of crosslinking CTLA-4 to the TCR (Fig. 1C) as it lacks LAG-3.

The test and control fusion proteins were expressed in Chinese hamster ovary cells and purified with affinity chromatography on a protein G column. Aggregates were removed using size exclusion chromatography. The test bispecific fusion protein (CD80wa-LAG-3-Fc) is referred to as BsB (nucleotide sequence: SEQ ID NO. 3; amino acid sequence: SEQ ID NO: 4), and the control construct (CD80wa-Fc) is known as BsBA (nucleotide sequence: SEQ ID NO. 16; amino acid sequence: SEQ ID NO: 17). As expected, both fusion proteins appeared as dimers on non-reducing SDS-PAGE gels (BsB, 200 kDa; BsBA 140 kDa) and as monomers (BsB, 100 kDa; BsBA 70 kDa) on reducing SDS-PAGE gels. Their identities were further confirmed by Western blotting, using antibodies against LAG-3 and CD80.

Example 2

BsB inhibits T cell activation in an allogenic mixed lymphocyte reaction.

The relative ability of BsB and BsBA to inhibit T cell activation was assessed in an allogenic mixed lymphocyte reaction by measuring the production of IL-2. Naïve CD4⁺CD25⁻CD62L^{high}CD44^{low} T cells that had been purified from BALB/c mice were mixed with APCs isolated from C57BL/6 mice in the presence or absence of the BsB or BsBA. Murine IgG2a and CTLA-4Ig, a co-stimulation inhibitor that binds to CD80/86 and blocks their binding to CD28, were included as negative and positive controls, respectively. Inclusion of BsB but not BsBA in the mixed lymphocyte reaction inhibited IL-2 production albeit not to the same extent as that achieved by CTLA-4Ig (Fig. 2). This difference was likely the result of BsB-mediated T cell inhibition occurring later than CTLA-4Ig-mediated inhibition. More specifically, for BsB, inhibition only occurred after CTLA-4 was upregulated following T cell activation. The inability of BsBA to reduce IL-2 production strongly suggests that engagement of CTLA-4 alone is insufficient to prevent T cell activation because concurrent crosslinking to the TCR is required. To exclude the possibility that the LAG-3 portion of BsB plays a role in T cell inhibition, LAG-3Ig was tested in this assay and verified not to inhibit T cell activation.

Example 3

BsB directs T cell differentiation into Tregs.

Early termination of TCR signaling by withdrawal of antigen stimulation, inhibition of mTOR signaling, suboptimal TCR stimulation due to a low affinity antigen, or weak co-stimulation during T cell activation have been shown to induce Foxp3⁺ expression and skew T cell differentiation toward a Treg phenotype (Delgoffe et al., (2009) *Immunity* 30:832-844; Haxhinasto et al., (2008) *J. Exp. Med.* 205:565-574; Sauer et al., (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:7797-7802). As BsB forces early engagement of the TCR by activation-induced CTLA-4 with consequent attenuation of TCR signaling, its ability to generate Foxp3⁺ Tregs was also evaluated. Naïve CD4⁺CD62L^{high}GFP⁺ T cells prepared from Foxp3-EGFP knock-in mice (Haribhai et al., (2007) *J. Immunol* 178:2961-2972) were mixed with LPS-treated allogenic APCs in the presence of BsB or BsBΔ. Flow cytometry analysis of the cells after five days of culture revealed a large number of CD4⁺CD25⁺GFP⁺ T cells among the BsB-treated cells (Fig. 3A, middle left panel) but not among cells treated with mouse IgG2a (Fig. 3A, top left panel) or the BsBΔ control (Fig. 3A, bottom left panel), suggesting that these CD4⁺CD25⁺GFP⁺ T cells were Foxp3⁺ Tregs. To confirm this finding, cell culture media were collected and assayed for the signature Treg cytokines, IL-10 and TGF-β (Cools et al., (2008) *J. Cell Mol. Med.* 12:690-700). Large amounts of IL-10 and TGF-β were detected in the media of BsB-treated cells (Fig. 3A, left panels) but not in media of cells treated with BsBΔ or mIgG2a. Surprisingly, CTLA-4Ig did not induce generation of GFP⁺ Tregs or IL-10 and TGF-β production. Without being bound to a particular theory, the mechanism by which CTLA-4Ig curtails the T cell response is different from that of BsB. LAG-3Ig alone or in combination with BsBΔ also failed to induce generation of GFP⁺ Tregs, suggesting that BsB-mediated crosslinking of CTLA-4 with the TCR was required for Treg induction.

Example 4

Induction of Tregs by BsB requires self-stimulated TGF-β

The concurrent detection of elevated levels of IL-10 and TGF-β following treatment with BsB raised the possibility that the cytokines, TGF-β in particular, played a role in facilitating the generation of Tregs (Fig.3A). To address this, culture media were collected over a period of five days and analyzed for cytokine and Foxp3⁺ Treg content. Elevated IL-10 and TGF-β levels were detected as early as day 2 post-treatment, and Foxp3⁺ Tregs were detected after day 3. Without being bound to a

- particular theory, the endogenous production of TGF- β presumably stimulated by BsB, is involved in Treg differentiation. Addition of an anti-TGF- β antibody (clone 1D11), but not an isotype control IgG (clone 13C4), to the Treg induction assay completely blocked the appearance of Foxp3⁺ Tregs (Fig. 3B). Without being bound
- 5 to a particular theory, the early engagement of CTLA-4 and its subsequent crosslinking to the TCR by BsB stimulated endogenous TGF- β production, which in turn encouraged Treg differentiation. Crosslinking of CTLA-4 and the TCR has been previously reported to induce TGF- β production (Chen et al., (1998) *J. Exp. Med.* 188:1849-1857), although Treg differentiation was not assessed in this study.
- 10 Tregs have shown considerable therapeutic potential in modulating the disease manifestations in several animal models of autoimmune diseases. However, the importance of the specificity of the induced Tregs against the relevant antigens has been highlighted. Non-antigen specific Tregs that will not be activated against particular autoantigens in the context of autoantigen-specific reactive T cells are
- 15 presumably not functionally immunosuppressive. Hence, approaches that facilitate the generation of large numbers of antigen-specific Tregs are highly desirable for treating these ailments. Moreover, strategies that facilitate the de novo induction of antigen-specific Tregs in situ (e.g. in islets of pancreas for T1D or in the lamina propria for ulcerative colitis or Crohn's disease) are preferred over the use of adoptive
- 20 transfer of *in vitro* differentiated or expanded Tregs.

Example 5

BsB-induced Tregs are functionally suppressive in a cell-cell contact-dependent manner.

- To assess whether the BsB-induced Tregs were functionally suppressive, BsB-
- 25 induced Tregs and TGF- β -induced Tregs, which served as a control, were purified using fluorescence-activated cell sorting (FACS) and mixed with CFSE-labeled syngeneic responder T cells at different ratios and allogenic APCs. Cells were co-cultured for three days in either transwells or regular culture wells, after which the proliferation of responder T cells was analyzed using flow cytometry. As
- 30 summarized in Fig. 5A, both BsB- and TGF- β -induced Tregs cultured in regular culture wells almost completely inhibited the proliferation of the responder T cells. The potency of the suppressive activity of the BsB-induced Tregs was comparable to

that of TGF- β -induced Tregs. In contrast, Tregs generated by either BsB or TGF- β did not significantly inhibit the proliferation of responder T cells when the T cells were separated from the Tregs in a transwell. Without being bound to a particular theory, Treg suppressive activity depended on cell-cell contact and was not mediated by secreted cytokines or other factors. Supporting this notion, inclusion of an antibody to IL-10 (clone JES5-2A5) in the regular culture well did not affect the suppressive activity of either the BsB- or the TGF- β -induced Tregs (Fig. 5B). The addition of an antibody to TGF- β 1D11 also did not affect the suppressive activity of BsB-induced Tregs, although it partially reduced suppression by TGF- β -induced Tregs (Fig. 5B).

10 Example 6

BsB directs differentiation of OT-II T cells into antigen-specific Tregs.

As it was found that a bifunctional fusion protein comprising CD80wa and LAG3 (BsB) that crosslinks CTLA-4 to the TCR (via MHCII) can induce the production of Foxp3⁺ Tregs in an allogenic MLR, the potential of BsB at eliciting the production of antigen-specific Tregs was examined. To investigate this prospect, naïve OT-II T cells were purified from transgenic mice harboring transgenes encoding the TCR (α - and β - subunits) specific for a chicken ovalbumin peptide (323-339) (Barnden et al., 1998) and mixed with syngeneic APCs in the presence of Ova323-339. After 5 days of culture, significantly greater amounts of Foxp3⁺ Tregs were detected in OT-II T cells that had been treated with BsB (Fig. 4A, middle left panel) than by the mIgG control (Fig. 4A, upper left panel) or by CTLA-4Ig (data not shown). This induction of Tregs was inhibited by the inclusion of anti-TGF- β antibody in the cultures (Fig. 4A, bottom left panel). Without being bound to a particular theory, differentiation was mediated by endogenously produced TGF- β in an autocrine or paracrine manner. Levels of IL-2 were decreased while those of IL-10 and TGF- β were increased in the media of BsB-treated cells (Fig. 4A, right panels).

To monitor the proliferative activity of the induced Tregs, OT-II cells were preloaded with the fluorescent tracer, CFSE. As shown in Fig. 4B, BsB-induced Foxp3⁺ Tregs were determined to be proliferative as indicated by a dilution of the CFSE signal. As expected, the addition of CTLA-4Ig, a co-stimulatory blocker, reduced T cell proliferation. Hence, BsB was able to inhibit T cell activation and induce the production of Tregs in both an allogenic MLR and antigen-specific setting.

Example 7

Induction of Tregs by BsB may involve attenuation of the AKT/mTOR signaling pathway.

Recent reports have indicated that the AKT and mTOR signaling pathways play
5 important roles in determining T cell fate. The presence of constitutively active AKT
in T cells diminishes Treg differentiation in a rapamycin-sensitive manner
(Haxhinasto et al., 2008), suggesting that the AKT and mTOR signaling pathways
intersect to influence Treg fate. Moreover, T cells deficient in mTOR differentiate to
Tregs more readily than normal control T cells (Delgoffe et al., (2009) *Immunity*
10 30:832-844). An obligatory role for the co-inhibitory molecules PD-1/PD-L1 in
controlling adaptive Treg development by antagonizing AKT/mTOR has also been
reported (Francisco et al., (2009) *J. Exp. Med.* 206:3015-3029). To determine if these
pathways are also involved in BsB-mediated induction of Tregs, anti-CD3 and anti-
CD28 antibodies were co-immobilized with BsB, mIgG, or PD-L1 on 96-well plates,
15 onto which naïve T cells were seeded. Eighteen hours post-activation, the cells were
stained with fluorescently-labeled antibodies against phosphorylated AKT and mTOR
and analyzed by flow cytometry. Phosphorylation of both AKT and mTOR was
attenuated by BsB and PD-L1 co-immobilization (Fig. 6). Without being bound to a
particular theory, signaling events mediated by CTLA-4 and PD-L1 inhibitory
20 molecules may converge at some point along the AKT/mTOR signaling pathway
during T cell activation to regulate Treg differentiation.

Example 8

Exposure to BsB sustains Foxp3⁺ expression in induced Tregs.

In vitro-induced Tregs, unlike fully committed natural Tregs, are reportedly less
25 stable and can lose Foxp3⁺ expression upon extended culture in the absence of the
initial inducer (e.g., TGF- β or retinoic acid) (Selvaraj and Geiger, (2007) *J. Immunol.*
178:7667-7677). In the current study, BsB-induced Tregs showed similar instability,
with some cells losing Foxp3 expression following repeated culture (Fig. 7). To test
whether re-stimulation by BsB could prolong Foxp3 expression, Tregs were first
30 induced by coating 96-well plates with both anti-CD3/anti-CD28 antibodies and BsB.
Purified Tregs were then subjected to an additional round of culture in the presence or
absence of BsB. Re-stimulation of the purified Tregs with BsB allowed for

maintenance of a large population (~93% of total Tregs) of Foxp3⁺ Tregs (Fig. 7, bottom right panel), compared to ~40% Foxp3 expression in response to the IgG control (Fig. 7, upper right panel).

Example 9

5 Pharmacokinetics of BsB in mice.

Prior to testing the therapeutic utility of BsB in animal models of autoimmune diseases, its pharmacokinetic profile was determined to help design a dosing regimen *in vivo*. Intraperitoneal injection of BsB into C57BL/6 mice resulted in a measurable rise in circulating levels followed by rapid clearance with an estimated plasma half-life (t_{1/2}) of ~12 hr (Fig. 8A). This profile was unexpected since the pharmacokinetics of Fc-containing fusion proteins or antibodies is typically more prolonged. As binding of antibodies to the neonatal Fc receptor (FcRn) is primarily responsible for their prolonged half-lives (Roopenian and Akilesh, 2007), the relative abilities of BsB and a control mouse IgG2a to bind FcRn were compared. Figure 8B shows that the binding characteristics of both proteins to the FcRn were very similar indicating that a defect in the binding of BsB to FcRn was unlikely to be the cause of its rapid clearance from the circulation.

Another potential explanation for the rapid clearance of BsB could be due to its uptake by carbohydrate receptors on non-target cells. Examples of such receptors include the asialoglycoprotein receptor (ASGPR) on hepatocytes (Weigel, 1994) and the mannose receptor on macrophages and endothelial cells of the reticuloendothelial system (Pontow et al., 1992). Analysis of BsB using the NetNGlyc server suggested it has the potential to harbor up to 10 asparagine-linked oligosaccharide side chains per monomer (Fig. 9). A monosaccharide composition analysis indicated that BsB contained approximately 37 mannose residues, and all the predicted asparagine-linked glycosylation sites may have been used because each of these asparagine-linked oligosaccharide glycans contains the core-mannose structure with three mannose residues (a total of 30 mannose residues). In addition, a small amount of high-mannose type oligosaccharides may also exist to account for the extra mannose residues. Indeed, significant amounts of under-sialylated tri- and tetra-antennary asparagine-linked, as well as some high-mannose type oligosaccharides were identified by mass spectrometry of permethylated glycans released from the protein.

This projection is also consistent with BsB's molecular weight of 100 kDa as indicated by an SDS-PAGE analysis, as opposed to BsB's calculated weight of 80 kDa. The added presence of oligosaccharides contributed to the difference (20 kDa) in molecular weight. Moreover, BsB exhibited a ratio of sialic acids to galactose of 0.68 (Fig. 9), indicating that the glycans were incompletely sialylated. Without being bound to a particular theory, the carbohydrate-mediated clearance of BsB by the ASGPR contributed to its rapid clearance from circulation.

Example 10

A short course of treatment with BsB delayed the onset of autoimmune diabetes in NOD mice.

As the EC₅₀ of BsB for inducing Tregs *in vitro* was estimated to be about 100 nM and its circulating half-life was short (t_{1/2} at ~12h), BsB was tested in NOD mice in a late prevention paradigm. NOD mice were administered BsB over a short interval (every other day for 4 weeks) when they were between 9 and 12 weeks of age. At this age, autoreactive T cells and insulitis are already evident but the mice have yet to develop overt diabetes. As shown in Figure 10A, NOD mice treated for 2 weeks with BsB showed a modest but statistically significantly increase (25%) in the number of Foxp3⁺ Treg in the blood when compared to saline-treated controls. However, this increase in Tregs was transient as a difference in the number of Tregs after 4 weeks of treatment or at later times points was unable to be detected. A similar transient increase in Tregs in lymphoid organs was noted previously following treatment of NOD mice with an anti-CD3 antibody (Nishio et al., 2010). Without being bound to a particular theory, the BsB-induced Tregs may have reverted to Foxp3⁻ T cells after cessation of treatment. They may also have been recruited by specific target tissues (e.g. pancreas) to execute their function. Regardless, this short course of treatment with BsB in a late prevention treatment paradigm appears to modestly delay the onset of disease and decrease the number of mice presenting with overt T1D (Fig. 10B).

The modest response noted may have been due to the presence of active insulitis in the 9 week-old NOD mice prior to commencement of therapy. An inflammatory milieu has been shown to favor the conversion of activating T cells to Th17 cells and suppress their conversion to Tregs. Inflammatory cytokines such as IL-6 or IL-4 have also been shown to inhibit Treg conversion and promote the loss of Foxp3⁺ expression

in Tregs (Caretto et al., 2010; Kastner et al., 2010; Koenen et al., 2008). To circumvent these challenges, NOD mice were treated starting at an earlier age (4 week-old) prior to overt induction of auto-reactive T cells and insulinitis. CTLA-4Ig was also included as a positive control in this study as Bluestone and colleagues (Lenschow et al., 1995) had demonstrated a benefit using this agent in this model; mIgG2a was used as an additional negative control to saline. In contrast to the results in older mice (Fig. 10A), the number of Foxp3⁺ Tregs in the peripheral blood of younger NOD mice treated for 2 weeks with BsB was not increased over those administered saline or mIgG (Fig. 11A). Without being bound to a particular theory, this might be because the number of auto-reactive T cells in 4 week-old NOD mice (in contrast to 9-12 week old mice used in the earlier study) was very low. The number of induced antigen-specific Tregs was likely too small to register beyond the basal levels present in the animals. A significantly lower incidence of T1D was noted in NOD mice administered BsB when compared to the saline-treated controls prior to 24 weeks of age (Fig. 11B). However, this benefit was reduced at the later time points.

Consistent with the report of NOD mice administered CTLA-4Ig (Salomon et al., 2000), the levels of Tregs in the blood (Fig. 11A) were significantly depressed presumably because of CTLA-4Ig's effects on CD28/B7 signaling (Tang et al., 2003). Treatment with CTLA-4Ig also aggravated the disease with mice exhibiting an earlier onset of disease (Fig. 11B) and higher penetrance of disease when compared to the saline- and mIgG-treated controls (Fig. 11B). The reason for the discrepancy between these findings and those reported by Bluestone and colleagues (Lenschow et al., 1995) is unclear but may be due to the differences in the CTLA-4Ig used or the dosing regimen employed. In the present studies, a dose of 10 mg/kg of human CTLA-4Ig (Orencia) was used instead of 2.5 mg/kg of mouse CTLA-4Ig by Bluestone and colleagues. Moreover, BsB treatment was not extended beyond 7 weeks. Without being bound to a particular theory, the use of a higher dose of CTLA-4Ig afforded a more complete blockade of the co-stimulatory signal required for Treg homeostasis.

Example 11

A longer course of treatment with BsB significantly delayed the onset and reduced the incidence of autoimmune diabetes in NOD mice.

Potential reasons for the observed modest benefits of BsB at addressing the disease in NOD mice in the earlier studies include the deployment of a relatively short-course of treatment, the moderate potency of BsB at inducing the production of Tregs (EC_{50} at > 100 nM), and the short circulating half-life of BsB that may have limited its exposure. As the potency and circulating half-life of BsB are intrinsic to the molecule and therefore not amenable to facile change, a longer course of treatment was tested. To this end, NOD mice were treated with BsB for 10 weeks instead of 4 weeks starting when the mice were at 4 weeks of age. As shown in Figure 12A, NOD mice treated for 10 weeks with BsB exhibited a significant delay in the onset of T1D. Importantly, by 35 weeks of age, only ~13% of BsB-treated NOD mice developed T1D as compared to over 70% in the saline-treated controls. Thus, extended treatment of NOD mice with BsB appeared to have protected the animals from developing autoimmune diabetes.

At the conclusion of the study (when mice were 35 week-old), the animals were sacrificed and their pancreata were collected for histopathological analysis. Adjacent serial sections were stained with H&E for a general assessment of the islets, probed with an anti-insulin antibody to detect the presence of insulin in the β -cells, and double stained with anti-CD3 and anti-Foxp3 antibodies to locate T cells and Tregs.

Due to the genetic heterogeneity of the NOD mice, a small number of the untreated animals did not develop disease at 35 weeks of age. Analysis of the islets of these non-diabetic animals (from the saline-treated cohort) showed the β -cells were intact with no obvious evidence of lymphocytic infiltration or insulinitis, (Fig. 12B, panels a-c). A few Foxp3⁺ Treg cells were present in the islets of these mice (arrows in panel c). In contrast, islets from diabetic NOD mice (from the saline-treated cohort) revealed the presence of invasive insulinitis (Fig. 12B, panel d) and complete destruction of the β -cells (panel e). In addition to CD3⁺ T cells and Foxp3⁺ Tregs, large numbers of non-T cell lymphocytes were also evident (Fig. 12B, panel f). Similar histopathological findings were noted in the corresponding BsB-treated mice that remained disease-free at the end of the study or that developed T1D during the study. Interestingly, in ~50% of the islets of BsB-treated NOD mice that remained non-diabetic, evidence of peri-insulinitis were noted (Fig. 12B, panel g); however, the β -cells were well preserved (Fig. 12B, panel h). Staining with antibodies indicated that the cells at the periphery of the islets comprise primarily CD3⁺ T cells and Tregs.

(Fig. 12B, panel i). An enlargement of a section of the image (red square in Fig. 12B, panel i) clearly revealed the presence of numerous Foxp3⁺ Tregs (yellow arrows in Fig. 12B, panel j) that were interspersed with non-Foxp3⁺ but CD3⁺ T cells (black arrow heads in Fig. 12B, panel j) as well as non-T cell mononucleocytes (blue nuclei).

5 The development of peri-insulitis has been noted in young (4-10 week-old) NOD mice (Anderson and Bluestone, 2005) and in older mice treated with other efficacious therapeutic agents that delayed or reversed new onset T1D in NOD mice (Chatenoud et al., 1994; Daniel et al., 2011; Simon et al., 2008; Vergani et al., 2010). Hence, a longer course of treatment of NOD mice with BsB protected the animals from
10 developing invasive insulitis and overt T1D. Without being bound to a particular theory, this was mediated, at least in part, by the de novo and possibly in situ induction of islet antigen-specific Tregs.

Crosslinking CTLA-4 and TCR via MHCII using a novel bispecific fusion protein (BsB) efficiently induced the production of antigen-specific Tregs as well as the anti-
15 inflammatory cytokines, IL-10 and TGF- β . Previous studies showed that Tregs are critical for conferring immune tolerance and that antigen-specific Tregs are more efficacious in animal models of autoimmune diseases. BsB was further evaluated in animal models of autoimmune diseases, such as T1D. Without being bound to a particular theory, it was hypothesized that if BsB promoted the induction of antigen-
20 specific Tregs during the early phase of activation of autoreactive T cells in NOD mice it can delay the onset or halt the progression of disease by converting the autoreactive T cells that are undergoing activation to Tregs.

Despite BsB exhibiting a modest potency (due to its moderate affinity for the MHC-II and TCR) and a short circulating half-life (which limited its exposure), a short course
25 of treatment reproducibly delayed the onset of T1D in NOD mice treated at an early age (between 4-6 weeks of age) and when they were older (between 9-12 weeks of age). However, the observed benefits were modest and unsustained. A longer course of treatment (10 weeks) of NOD mice (between 4 and 13 weeks of age) with BsB significantly delayed the onset of disease and the incidence of animals developing
30 T1D. Without being bound to a particular theory, this benefit was imparted by the de novo generation of induced Tregs that were either produced locally (e.g. in the pancreas or pancreatic draining lymph nodes) or distally that were then recruited to the pancreas to protect the islets from destruction by autoreactive T cells and other

non-T cell leukocytes. Immunohistochemical staining of sections of pancreatic tissues of 35 week-old BsB-treated mice that remained non-diabetic clearly indicated an increase in the number of Foxp3⁺ Tregs at the periphery of the islets. Visually, they appeared to be preventing CD3⁺ T cells and non-T cell lymphocytes from entering the islets. This phenomenon was observed in ~50% of the islets of BsB-treated NOD mice that remained non-diabetic at the end of the study but in none of the islets of diabetic animals in the control group. The islets of a few non-diabetic mice in the control group remained devoid of lymphocytic infiltrations and were insulinitis-free. It is known that because of the genetic heterogeneity of NOD mice, a few animals in a cohort of this size never develop diabetes within this timeframe. In the remaining ~50% of the non-diabetic animals in the BsB-treated group, the islets were also devoid of lymphocytic infiltrations and insulinitis-free. Possibilities for the disease-free status of these mice include BsB treatment and the genetic background.

Consistent with the histopathological findings, a small but statistically significant increase in the number of Foxp3⁺ Tregs was detected in the blood of BsB-treated animals (treated from 9-12 weeks of age) when compared to untreated controls. This increase was not evident in mice that started treatment at a younger age (4 week-old). Without being bound to a particular theory, this may be because more autoreactive T cells were undergoing activation in the 9 week-old than in the 4 week-old mice. The low levels of autoreactive T cells in the 4 week-old mice might have precluded detection of induced Tregs beyond that in the existing milieu of Tregs. The increase in Tregs was also transient in nature. As a similar observation was noted in animals subjected to anti-CD3 therapy (Nishio et al., 2010), it is possible that the induced Tregs were unstable and lost expression of Foxp3. It is more conceivable that the Tregs were recruited from circulation to affected target tissues. In contrast, NOD mice treated with CTLA-4Ig exhibited a significant decrease in the number of circulating Tregs. Treatment also aggravated the disease as evidenced by an expedited onset of disease and a higher incidence of animals displaying overt disease. This is consistent with previous reports showing that the co-stimulatory pathway is involved in Treg homeostasis and that a lack of co-stimulation reduces the production of Tregs. Blocking or knocking-out CD80 or CD86 in NOD mice also results in an earlier onset of T1D (Salomon et al., 2000; Tang et al., 2003).

The appearance of peri-insulitis is typically observed in the pancreas of NOD mice between 4 and 9 weeks of age. If uncontrolled, invasive insulitis ensues leading to the complete destruction of β -cells and the development of overt diabetes between 12 and 35 weeks of age. The pancreata of non-diabetic NOD mice that had been treated for 10 weeks with BsB and analyzed at 35 weeks of age exhibited evidence of peri-insulitis that appeared to be arrested in their progression. No indication of invasive insulitis or excessive destruction of insulin-producing β -cells was noted. There are other reports of different therapeutic interventions similarly delaying or preventing disease in NOD mice (Shoda et al., 2005). The results here are most akin to those reported by Lee et al. (2010), who showed that transfer of diabetogenic $CD4^+CD25^-$ BDC2.5 T cells depleted of $CD4^+CD25^+$ Tregs into female NOD/SCID mice expedited the development of invasive insulitis when compared to mice administered total $CD4^+$ T cells containing $CD4^+CD25^+$ Tregs. Invasive insulitis was largely dominated by infiltration of dendritic cells (DC) rather than by BDC2.5 T cells per se. The authors surmised from their study that Tregs regulated the invasiveness of DCs into the islets by modulating, at least in part, the chemotaxis of DCs in response to the chemokines CCL19 and CCL21 secreted by the islets. The immunohistochemical staining patterns for $Foxp3^+$ Tregs, $CD3^+$ T cells and non-T cell leukocytes noted in the pancreatic sections of BsB-treated, non-diabetic NOD mice are consistent with their findings (Fig. 12B). Without being bound to a particular theory, Tregs produced in NOD mice in response to BsB likely acted to halt the migration of autoreactive T cells and non-T cell lymphocytes into the islets. A longer course of treatment with BsB was more effective because this generated a more robust and sustained induction of Tregs. That continuous stimulation of induced Tregs with BsB in cell cultures extended the expression of $Foxp3^+$ in Tregs is supportive of this notion (Karman et al., 2012).

Cell therapy using freshly isolated, *ex vivo* expanded or *in vitro* induced Tregs in animal models of autoimmune diseases or organ transplants have demonstrated that adoptive transfer of Tregs can restore the balance of Tregs versus effector T cells, thereby controlling the exuberant autoimmunity associated with these diseases (Allan et al., 2008; Jiang et al., 2006; Riley et al., 2009; Tang et al., 2012). However, the use of adoptive transfer as a therapeutic strategy presents several challenges to translation into the clinic. Firstly, the number of autologous Tregs that can be isolated from

peripheral blood of a human subject is limiting. Hence extensive ex vivo expansion of the Tregs is often necessary, which may alter their functionality and purity. Secondly, as the isolated Tregs are polyclonal, they can exert a pan-immune suppressive function on non-target effector T cells. Thirdly, and most importantly, the plasticity of Tregs poses a significant challenge (Bluestone et al., 2009; Zhou et al., 2009a). It has been shown that adoptively transferred Tregs can lose Foxp3 expression and redifferentiate into Th17 cells (Koenen et al., 2008) or pathogenic memory T cells (Zhou et al., 2009b) which raises the risk of aggravating the autoimmunity or inflammation. Consequently, a therapeutic that induces the generation of Tregs in an antigen-specific manner in situ is more advantageous over adoptive Treg cell therapy. The results presented herein demonstrate the utility and effectiveness of such an agent (BsB) that crosslinks CTLA-4 to MHCII in the context of a mouse model of T1D. The combined demonstration of production of IL-10, TGF- β and Tregs in response to treatment with BsB as well as efficacy in the NOD mouse model of T1D has the potential to provide a novel therapeutic concept. BsB also offers additional advantages over other immune modulators in that it does not affect resting T cells or other lymphocytes. The numbers and percentages of CD4⁺ T cells and CD19⁺ B cells in the periphery remained the same in all our NOD studies. Without being bound to a particular theory, this approach is effective in delaying or halting disease progression. The development of BsB variants that are more potent and that harbor a more favorable pharmacokinetic profile should confirm these studies. Thus, this concept may also be applied towards the management of other immune-mediated diseases.

Results reported herein were obtained using the following methods and materials unless indicated otherwise.

Animals. Female wild-type C57BL/6 (H-2^b), BALB/c(H-2^d), transgenic OT-II mice expressing the mouse α -chain and β -chain T cell receptor specific for chicken ovalbumin 323-339(Ova₃₂₃₋₃₃₉) in C57BL/6 genetic background, and female non-obese diabetic (NOD/LtJ) mice were purchased from The Jackson Laboratory. Animals were maintained in a pathogen-free facility and studies were conducted in accordance with the guidelines issued by the U.S. Department of Health and Human Services (NIH Publication No 86-23) and by Genzyme's Institutional Animal Care and Use committee.

Antibodies and reagents. Functional grade or fluorescently-labeled anti-mouse CD3 (clone 145-2C11), CD25, insulin and Foxp3⁺ antibodies were purchased from eBioscience or BD Biosciences. Murine CTLA-4-Fc and human CTLA-4Ig (Orencia) were purchased from R&D Systems, Inc. and Bristol-Myers Squibb, respectively.

- 5 Mouse IgG2a isotype control was obtained from BioXCell Inc. CFSE, ultralow Ig fetal bovine serum (FBS), and other cell culture media were from Invitrogen. Chicken Ova₃₂₃₋₃₃₉ peptide was obtained from New England Peptide.

- Construction and production of the bispecific fusion protein BsB.* Construction and expression of the bispecific fusion protein (BsB) comprising the extracellular domains of CD80w88a and LAG-3 as well as the Fc of mouse IgG2a (CD80wa-LAG-3-Fc, BsB) were described previously (Karman et al., 2012).
- 10

- Biacore assays and monosaccharide composition analysis.* Biacore was used to compare the binding of BsB and mIgG2a to the mouse neonatal Fc receptor (FcRn). Briefly, a CM5 chip was immobilized with ~1430 RU of mouse FcRn-HPC4 using amine chemistry. Each sample was serially diluted 1:2 to final concentrations of between 200 and 6.25 nM in PBSP (PBS with 0.005% Surfactant P-20), pH 6.0 and injected for 3 min in duplicate, followed by 3 min wash with dissociation buffer. The surface was regenerated with 10mM sodium borate and 1M NaCl, pH 8.5. The carbohydrate monosaccharide composition of BsB was analyzed according to the protocol described by Zhou et al. (Zhou et al., 2011).
- 15
- 20

- Isolation of naïve T cells.* Naïve T cells from the spleens and lymph nodes of 8-12 week old female BALB/c or OT-II mice were purified by magnetic separation followed by fluorescence-activated cell sorting. Cells were first negatively selected by magnetic cell separation (Miltenyi Biotech) and then sorted as CD4⁺CD25⁻ CD62L^{hi}CD44^{low} cells to a purity of greater than 98%.
- 25

- Antigen-specific Treg induction assay.* Assays in an allogenic MLR setting was performed as previously reported (Karman et al., 2012). For antigen-specific T cell activation, 10⁵ naïve OT-II T cells were mixed in round-bottom 96-well plates with 10⁵ irradiated syngeneic APCs in the presence of Ova₃₂₃₋₃₂₉ at 0.5 µg/ml and 1 µg/ml soluble anti-CD28 (clone 37.51, eBioscience). The test constructs, mouse IgG2a, or mouse CTLA-4Ig were added to the cultured cells at a saturating concentration of 100 µg/ml. The cells were cultured for 5 days to induce production of Tregs and analyzed
- 30

by flow cytometry. Media were collected for analysis of IL-2, IL-10 and TGF- β using ELISA kits per the manufacturer's instructions. To assess T cell proliferation, purified naïve OT-II T cells were labeled with 5 μ M CFSE for 5 min at 37°C. They were then washed to remove unbound CFSE and used in Treg induction assays as described above. Cells were cultured for 5 days to allow them to divide before being analyzed by flow cytometry. To detect Foxp3⁺ in T cells, cells were stained for surface markers as described above followed by permeabilizing with Fix/Perm buffer (eBioscience) and staining with PE-Cy7 conjugated anti-Foxp3 antibody (clone FJK-16s, eBioscience).

- 10 *Pharmacokinetics measurements of BsB in mice.* The pharmacokinetics of BsB was determined in 8 week-old C57BL/6 mice. 20 mg/kg of BsB was administered into mice by intraperitoneal injection. Blood was collected by saphenous vein bleeding at 1 hr, 5 hr, 24 hr, 48 hr, and 72 hr after administration. The levels of BsB at each time point were measured using an ELISA assay. Briefly, 100 μ l (1 μ g/ml) of an anti-mouse CD80 antibody in PBS were coated onto 96-well plates and incubated overnight at 4°C. Plates were blocked with 5% fetal bovine serum for 1 h, after which they were washed 4 times with PBS. 100 μ l of blood samples at various dilutions were then added into the wells. The plates were incubated for 2 hr with gentle shaking at room temperature and washed 4 times with PBS. Biotinylated anti-mouse LAG-3 antibody (1 μ g/ml) was added and incubated for 2hr. The plates were washed 4 times with PBS after which streptavidine-HRP was added. After 30 min, the plates were washed 6 times with PBS and developed for colorimetric measuring. Purified BsB diluted in assay diluent at various concentrations were used as standards.

- Treatment of NOD mice with BsB.* In the short course treatment, 4 week-old female NOD mice were treated with saline, 20 mg/kg BsB, 20 mg/kg mouse IgG2a, or 10 mg/kg human CTLA-4Ig (Orencia) three times a week by intraperitoneal injection over a period of 2.5 weeks. For the late prevention model, 9-12 week-old NOD mice were treated with saline or 20 mg/kg BsB as above for 4 weeks. For longer course treatment, NOD mice were treated with BsB or saline as above for 10 weeks from age of 4 weeks to 13 weeks. Non-fasting blood glucose levels were monitored weekly starting at 8 weeks of age. Mice were deemed diabetic when their glucose readings were greater than 300 mg/dL for three consecutive readings. Foxp3⁺ Tregs in peripheral blood was examined after two weeks of treatment by flow cytometry.

Briefly, 50 µl of whole blood was blocked with unlabeled anti-FcγRIIb and FcγRIII (clone 93, eBioscience) for 20 min. Cells were subsequently stained with fluorescently-labeled anti-CD4 antibody for 30 min and then washed. Red blood cells were lysed using FACS Lysing solution (BD Biosciences) for 5 min. After washing, 5 cells were fixed, permeabilized and stained with a FITC-labeled anti-Foxp3 antibody for 30 min as described above. Pancreata were dissected in half with one half fixed in neutral buffer formalin and the other placed into OCT compound and then frozen on dry ice.

10 *Statistical analysis.* Cumulative incidences of NOD mice presenting with T1D and hyperglycemia following treatment with BsB or controls were compared using the log-rank (Cox-Mantel) test in Prism 5 (Graphpad, city and state). A value of $p<0.05$ was considered statistically significant.

Histopathological analysis. Neutral buffer formalin-fixed pancreata was stained for CD3, Foxp3⁺ cells using an automated processor. Tissue sections were dewaxed 15 using xylene-ethanol, the antigens retrieved by incubating for 25 min in citrate buffer and then blocked with serum. Slides were incubated with an anti-CD3 antibody for 45 min, followed by a goat anti-rabbit horse radish peroxidase polymer for 20 min. Chromogen visualization of CD3 was obtained by incubating with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride for 2-4 min. To detect Foxp3⁺, sections were re- 20 blocked with serum, followed by exposure to an anti-Foxp3 antibody for 45 min. Slides were then incubated with a rabbit anti-rat IgG antibody for 30 min, followed by a goat anti-rabbit alkaline phosphatase polymer. Chromogen visualization was achieved using Fast Red for 10 min. Tissue sections were counterstained using hematoxylin for 2 min and washed 3 times with 0.05% Tween-20/Tris buffered saline 25 between steps. Adjacent serial sections were stained using an anti-insulin antibody as described above. Pictures were taken using a Nikon Eclipse E800 fluorescent microscope with an attached digital camera from Diagnostic Inc. and images acquired using the Spot Advanced software.

30

Sequences

Legend

CD80w88a = CTLA-4 ligand

IgG2a = IgG2 Fc region

G9 = Gly 9

5 Lag-3 = MHC ligand

H6 = His 6

SEQ ID NO. 1:

CTLA-4 BsB (Gene1) = mouse CD80w88a(aa1-235)-IgG2a(aa241-474)-G9-Lag-3(aa25-260)- H6

10 Nucleotide sequence of mouse surrogate construct (Gene1):

ATGGCTTGCAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTC
 CAAGGCTCATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTGCTCTTTCACAAGTGTCTTCAGA
 TGTTGATGAACAACTGTCCAAGTCAGTGAAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCG
 TTACAACTCTCCTCATGAAGATGAGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACAT
 15 GACAAAGTGGTGCTGTCTGTCATTGCTGGGAAACTAAAAGTGGCGCCCGAGTAT
 AAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTCTTATCATCCTGGGCCTGG
 TCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCGTFCAAAAGAAGGAAAGAGGAA
 CGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAGCTGACTTCTC
 TACCCCCAACATAACTGAGTCTGGAAACCCATCTGCAGACACTAAAAGGATTAC
 20 CTGCTTTGCTFCCGGGGGITTCCCAAAGCCTCGCTTCTCTTGGTTGGAAAATGG
 AAGAGAATTACCTGGCATCAATACGACAATTTCCCAGGATCCTGAATCTGAATTG
 TACACCATTAGTAGCCAACTAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGT
 GTCTCATFAAATATGGAGATGCTCACGTGTCAGAGGACTTCACCTGGGAGCCCA
 GAGGGCCCAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCT
 25 TGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGA
 TCTCCCTGAGCCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGAC
 CCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTACTCACAGCTCAG
 ACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTC
 CCCATCCAGCACCAAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAA
 30 CAACAAAGCCCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGT
 CAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTA
 AGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTT
 ACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAA

CCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAA
 AAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGCTCAGTGGTCCACGAGGG
 TCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAAGGCG
 GTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTGGGCCTGGGAAAGAGCTCCCCGTGGTGT
 5 GGGCCCAGGAGGGAGCTCCCGTCCATCTTCCCTGCAGCCTCAAATCCCCAAC
 CTGGATCCTAACTTTCTACGAAGAGGAGGGGTTATCTGGCAACATCAACCAGAC
 AGTGGCCAACCCACTCCCATCCCGGCCCTTGACCTTCACCAGGGGATGCCCTC
 GCCTAGACAACCCGCACCCGGTCGCTACACGGTGCTGAGCGTGGCTCCAGGA
 GGCCTGCGCAGCGGGAGGCAGCCCCTGCATCCCCACGTGCAGCTGGAGGAGC
 10 GCGGCCTCCAGCGCGGGGACTTCTCTCTGTGGTTGCGCCCAGCTCTGCGCAC
 CGATGCGGGCGAGTACCACGCCACCGTGCGCCTCCCGAACCGCGCCCTCTCC
 TGCAGTCTCCGCCTGCGCGTCGGCCAGGCCTCGATGATTGCTAGTCCCTCAGG
 AGTCCTCAAGCTGTCTGATTGGGTCTTTTGAAGTCTCCTTCAGCCGTCTGA
 CCGCCCAGTCTCTGTGCACTGGTTCCAGGGCCAGAACCGAGTGCCTGTCTACA
 15 ACTCACCGCGTCATTTTTTAGCTGAAACTTTCCTGTTACTGCCCCAAGTCAGCCC
 CCTGGACTCTGGGACCTGGGGCTGTGTCCTCACCTACAGAGATGGCTTCAATG
 TCTCCATCACGTACAACCTCAAGGTTCTGGGTCTGGAGCCCGTAGCCCACCATC
 ACCATCATCACTGA

SEQ ID NO. 2:

20 **CTLA-4 BsB (Gene1) = mouse CD80w88a(aa1-235)-IgG2a(aa241-474)-G9-Lag-
 3(aa25-260)- H6**

Translated protein sequence of mouse surrogate construct (Gene1):

MACNCQLMQDTPLLKFPCLILLFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYN
 SPHEDESEDRIYWQKHDKVVLVSVIAGKLKVAPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRG
 25 TYSCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPK
 PRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSED
 FTWEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSLSPMVTCVVVDVSE
 DDPDVQISWFVNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV
 NNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE
 30 WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN
 HHTTKSFSRTPGKGGGGGGGGGGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCSLKSPNLDPNF
 LRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGGLRSGR
 QPLHPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCSLRLRVGQ
 ASMIASPSGVKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGQNRVPVYNsprHFLAETF
 35 LLLPQVSPLDSGTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAHHHHHH

SEQ ID NO. 3:

CTLA-4 BsB (Gene2) = mouse CD80w88a(aa1-235)-G9-Lag-3(aa25-260)-IgG2a(aa241-474)

Nucleotide sequence of mouse surrogate construct (Gene 2):

```

5  ATGGCTTGCAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTC
   CAAGGCTCATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTGCTCTTTCACAAGTGCTTCAGA
   TGTTGATGAACAACGTGCCAAGTCAGTGAAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCG
   TTACAACCTCTCCTCATGAAGATGAGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACAT
   GACAAAGTGGTGCTGTCTGTCATTGCTGGGAAACTAAAAGTGGCGCCCGAGTAT
10  AAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTCTTATCATCCTGGGCCTGG
   TCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCGTTCAAAAGAAGGAAAGAGGAA
   CGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAGCTGACTTCTC
   TACCCCCAACATAACTGAGTCTGGAAACCCATCTGCAGACACTAAAAGGATTAC
   CTGCTTTGCTTCCGGGGGTTTCCCAAAGCCTCGCTTCTCTTGGTTGGAAAATGG
15  AAGAGAATTACCTGGCATCAATACGACAATTTCCCAGGATCCTGAATCTGAATTG
   TACACCATTAGTAGCCAACCTAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGT
   GTCTCATTAATATGGAGATGCTCACGTGTCAGAGGACTTCACCTGGGGCGGTG
   GCGGCGGAGGCGGTGGCGGTGGGCCTGGGAAAGAGCTCCCCGTGGTGTGGG
   CCCAGGAGGGAGCTCCCGTCCATCTTCCCTGCAGCCTCAAATCCCCAACCTG
20  GATCCTAACTTTCTACGAAGAGGAGGGGTTATCTGGCAACATCAACCAGACAGT
   GGCCAACCCACTCCCATCCCGGCCCTTGACCTTCACCAGGGGATGCCCTCGCC
   TAGACAACCCGCACCCGGTCGCTACACGGTGCTGAGCGTGGCTCCAGGAGGC
   CTGCGCAGCGGGAGGCAGCCCCTGCATCCCCACGTGCAGCTGGAGGAGCGCG
   GCCTCCAGCGCGGGGACTTCTCTCTGTGGTTGCGCCAGCTCTGCGCACCGAT
25  GCGGGCGAGTACCACGCCACCGTGCGCCTCCCGAACCGCGCCCTCTCCTGCA
   GTCTCCGCCTGCGCGTCGGCCAGGCCTCGATGATTGCTAGTCCCTCAGGAGTC
   CTAAGCTGTCTGATTGGGTCCCTTTGAACTGCTCCTTCAGCCGTCTGACCGC
   CCAGTCTCTGTGCACTGGTTCAGGGCCAGAACCGAGTGCCTGTCTACAACTC
   ACCGCGTCATTTTTTAGCTGAAACTTTCCTGTTACTGCCCCAAGTCAGCCCCCT
30  GGA CTCTGGGACCTGGGGCTGTGTCCTCACCTACAGAGATGGCTTCAATGTCT
   CCATCACGTACAACCTCAAGGTTCTGGGTCTGGAGCCCGTAGCCCCCAGAGGG
   CCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGT
   GGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCC
   CTGAGCCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGA
35  TGTCCAGATCAGCTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTACTCACAGCTCAGACACA

```

AACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCAT
 CCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACA
 AAGCCCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTA
 AGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAA
 5 CAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTG
 GAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGT
 CCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAA
 GAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGCTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGC
 ACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAATGA

10 SEQ ID NO. 4:

**CTLA-4 BsB (Gene2) = mouse CD80w88a(aa1-235)-G9-Lag-3(aa25-260)-
 IgG2a(aa241-474)**

Translated protein sequence of mouse surrogate construct (Gene 2):

MACNCQLMQDTPLLKFPCPRLILLFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYN
 15 SPHEDESEDRIYWQKHDKVLSVIAGKLKVAPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRG
 TYSCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPK
 PRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSED
 FTWGGGGGGGGGGGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCSLKSPNLDPNFLRRGGVIWQ
 HQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGGLRSGRQPLHPHVQLE
 20 ERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCSLRLRVGQASMIASPSGVL
 KLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNsprHFLAETFLLLPQVSPLDS
 GTWGCVLTYRDGFNVsITYNLKVLGLEPVAPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI
 FPPKIKDVLmISLSPMVTcVVVDVSEDDPDVQISWfVNNVEVLTAQTQTHREDYNST
 LRVVSALPIQHqDWMsGKEfKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEE
 25 EMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLR
 VEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

SEQ ID NO. 5:

**CTLA-4 BsB human construct wildtype nucleotide sequence = (human
 CD80(aa1-234)- G9-Lag-3(aa27-262-IgG1a(aa240-471)**

30 ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAA
 TTTCTTTCAGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTCAAGGTGTTATC
 CACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGT
 TTCTGTTGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAAGGAGAAGAAAAT
 GGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATATGGCCCGAGTACAAGAACC

GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
ATCTGACGAGGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAAAAGACGCTTT
CAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTAC
ACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAACCTTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCT
5 CAACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAG
AATTAATGCCATCAACACAACAGTTTCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGC
TGTTAGCAGCAAACCTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTC
ATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGC
GGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGG
10 GCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCC
AGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGAC
AGTGGCCCGCCCGCTGCCGCCCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACC
CGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCCGCCGCTACACGGTGTCTGAG
CGTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCCTGCAGCCCCGCGT
15 CCAGCTGGATGAGCGCGGCCGGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGC
CCAGCCCCGGCGCGCGGACGCCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGG
GACCGCGCCCTCTCCTGCCGCCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGA
CTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCAATTTGAACTGCT
CCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGGC
20 CAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCCTTAGCGGAAAGCTT
CCTCTTCCTGCCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCC
TCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGG
GTCTGCTGGTGCCCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
TGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT
25 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG
CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCC
30 CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
35 GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO. 6:

CTLA-4 BsB human construct wildtype translated protein sequence = (human CD80(aa1- 234)-G9-Lag-3(aa27-262-IgGla(aa240-471)

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV
 5 EELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY
 ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHL
 SWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF
 NWNTTGGGGGGGGGGSGAEVPWWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQ
 HQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQP
 10 RVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMT
 ASPPGSLRASDVVVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFL
 FLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 15 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
 LDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 7:

CTLA-4 BsB human construct variant nucleotide sequence 1 = (human CD80W84A/S190A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-

20 **IgGlaN596/297Q(aa240-471)**
 ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAA
 TTTCTTTT CAGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTT CAGGTGTTATC
 CACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGT
 TTCTGTTGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAAGGAGAAGAAAAT
 25 GGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATAGCCCCCGAGTACAAGAACC
 GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
 ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAAAAGACGCTTT
 CAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTAC
 ACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAATTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCT
 30 CAACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAG
 AATTAAATGCCATCAACACAACAGTTGCCCAAGATCCTGAACTGAGCTCTATGC
 TGTTAGCAGCAAACTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTC
 ATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGC
 GGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGG

GCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCC
 AGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGAC
 AGTGGCCCCGCCGCTGCCGCCCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACC
 CGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGGCCAGGCCCGAGCGCTACACGGTGCTGAG
 5 CGTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGT
 CCAGCTGGATGAGCGCGGCCGGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGC
 CCAGCCCCGGCGCGCGGACGCCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGG
 GACCGCGCCCTCTCCTGCCGCCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGA
 CTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCAATTTGAACTGCT
 10 CCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGGC
 CAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCACTTAGCGGAAAGCTT
 CCTCTTCCTGCCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCC
 TCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGG
 GTCTGCTGGTGCCCCGGGGCTCCGAGCCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
 15 AGCCCACCGAGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCCTCTT
 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTCACAT
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
 GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
 ACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG
 20 CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC
 CATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
 ACACCCTGCCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC
 TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
 TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
 25 GCTCCTTCTTCCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
 GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
 CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO. 8:

CTLA-4 BsB human construct variant translated protein sequence 1 = (human
 30 CD80W84A/S190A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-
 IgGlaN596/297Q(aa240-471)

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV
 EELAQTRIWQKEKKMVLTMMSGDMNIAPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY
 ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHL
 35 SWLENGEELNAINTTVAQDPETELYAVSSKLDNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF

NWNTTGGGGGGGGSGAEVPVWVAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTW
 QHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPERYTVLSVGPGLRSGRLPLQ
 PRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM
 TASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHHLAESFL
 5 FLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPPS
 PAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10 **SEQ ID NO. 9:**

**CTLA-4 BsB human construct variant nucleotide sequence 2 = (human
 CD80W84A/S190AS201A(aal -234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-
 IgGlaN596/297Q(aa240- 471)**

ATGGGCCACACACGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCTACCTCAA
 15 TTTCTTTTCAGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTCAGGTGTTATC
 CACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGT
 TTCTGTTGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAAGGAGAAGAAAAT
 GGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATAGCCCCGAGTACAAGAACC
 GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
 20 ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTICTGAAGTATGAAAAAGACGCTTTC
 AAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTACA
 CCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAACCTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCTC
 AACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAGA
 ATTAAATGCCATCAACACAACAGTTGCCCAAGATCCTGAACTGAGCTCTATGCT
 25 GTTGCCAGCAAACCTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTCA
 TCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGCG
 GTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGGG
 CCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCCA
 GGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGACA
 30 GTGGCCCGCCCGCTGCCGCCCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACCC
 GGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCCGAGCGCTACACGGTGCTGAGC
 GTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCCTGCAGCCCCGCGTC
 CAGCTGGATGAGCGCGGCGGCGAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGCC
 CAGCCCCGCGCGCGGACGCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGGG
 35 ACCGCGCCCTCTCCTGCCGCCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGACT

GCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCATTTTGAAGTGTCTC
CTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGGCC
AGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCCTTAGCGGAAAGCTTC
CTCTTCCTGCCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCCT
5 CACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGGG
TCTGCTGGTGCCCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAA
GCCCCACCGAGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCCTCTTC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG
CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG
10 TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA
CCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA
CACCTGCCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCT
15 GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

20 SEQ ID NO. 10:

**CTLA-4 BsB human construct variant translated protein sequence 2 = (human
CD80W84A/S190AS201A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-
IgG1aN596/297Q(aa240- 471)**

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV
25 EELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIAPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHL
SWLENGEELNAINTTVAQDPETELYAVASKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF
NWNTTGGGGGGGGGGSGAEVPVWVAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTW
QHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPERYTVLSVGPGLRSGRLPLQ
30 PRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM
TASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFL
FLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPPS
PAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG

QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
LDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 11:

CTLA-4 BsB human construct variant nucleotide sequence 3 = (human

5 CD80E196A/5190A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-
IgG1aN596/297Q(aa240-471)

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAA
TTTCTTTTCAGCTCTTGGTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTCAAGGTGTTATC
CACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGT
10 TTCTGTTGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAAGGAGAAGAAAAT
GGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATATGGCCCGAGTACAAGAACC
GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAAAAGACGCTTT
CAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTAC
15 ACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAATTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCT
CAACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAG
AATTAATGCCATCAACACAACAGTTGCCAAGATCCTGAAACTGCCCTCTATGC
TGTTAGCAGCAAACCTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTC
ATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGC
20 GGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGG
GCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCC
AGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGAC
AGTGGCCCGCCCGCTGCCGCCCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACC
CGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCCAGGCCCGAGCGCTACACGGTGTGAG
25 CGTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGT
CCAGCTGGATGAGCGCGGCCGCGAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGC
CCAGCCCGGCGCGCGGACGCCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGG
GACCGCGCCCTCTCCTGCCGCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGA
CTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCAATTTGAACTGCT
30 CCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGGC
CAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCACTTAGCGGAAAGCTT
CCTCTTCCTGCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCC
TCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGG
GTCTGCTGGTGCCCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
35 AGCCACCGAGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCCTCTT

CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
ACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG
5 CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC
CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA
TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
10 GCTCCTTCTTCCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO. 12:

CTLA-4 BsB human construct variant translated protein sequence 3 = (human
15 **CD80E196A/S190A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgG1**
aN596/297Q(aa240-471)

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV
EELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSISDFEIPSNIRRIICSTSGGFPEPHL
20 SWLENGEELNAINTTVAQDPETALYAVSSKLD FNM TTNH SFMCLIKYGH LRVNQTF
NWNTTGGGGGGGGGGSGAEVPVWVAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTW
QHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPERYTVLSVGPGLRSGRLPLQ
PRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM
TASPPGSLRASDVVVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHHLAESF
25 LFLPQVSPMDSGPWG CILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPP
SPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30 **SEQ ID NO. 13:**

CTLA-4 BsB human construct variant nucleotide sequence 4 = (human
CD80E196A/S190AS201A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgG1a
N596/297Q(aa240- 471)

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAA
 TTTCTTTTCTCAGCTCTTGGTGGTGGTGGTCTTTCTCACTTCTGTTTCAAGGTGTTATC
 CACGTGACCAAGGAAGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGT
 TTCTGYFGAAGAGCTGGCACAACTCGCATCTACTGGCAAAAGGAGAAGAAAAT
 5 GGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGAATATATGGCCCGAGTACAAGAACC
 GGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTGATCCTGGCTCTGCGCCC
 ATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAAAAGACGCTTT
 CAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCCTAC
 ACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAACCTTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCT
 10 CAACCTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAG
 AATTAATGCCATCAACACAACAGTTGCCCAAGATCCTGAAACTGCCCTCTATGC
 TGTGCGCAGCAAACTGGATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTC
 ATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGAATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGC
 GGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGGAGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGG
 15 GCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCCCCACAATCCCCCTCC
 AGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATCAGCCAGAC
 AGTGGCCCGCCCGCTGCCGCCCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACC
 CGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGGCCAGGCCCGAGCGCTACACGGTGTGAG
 CGTGGGTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGT
 20 CCAGCTGGATGAGCGCGGCGGACGCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGG
 CCAGCCCGGCGCGCGGACGCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGG
 GACCGCGCCCTCTCCTGCCGCTCCGTCTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGA
 CTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACTGGGTCAATTTGAACTGCT
 CCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCGGAACCGGGGC
 25 CAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCACTTAGCGGAAAGCTT
 CCTCTTCCTGCCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCC
 TCACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGG
 GTCTGCTGGTGGCCCGGGGCTCCGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACA
 AGCCACCGAGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCCTCTT
 30 CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT
 GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTAC
 GTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT
 ACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG
 CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCC
 35 CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
 ACACCCTGCCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACC
 TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA

TGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCCTATACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG
GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

5 **SEQ ID NO. 14:**

**CTLA-4 BsB human construct variant translated protein sequence 4 = (human
CD80E196A/S190AS201A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-
IgG1aN596/297Q(aa240- 471)**

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVS
10 EELAQTRIWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTY
ECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHL
SWLENGEELNAINTTVAQDPETALYAVASKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTF
NWNTTGGGGGGGGGGSGAEVPVWVAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTIN
QHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPERYTVLSVGPGLRSGRLPLQ
15 PRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM
TASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAESFL
FLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPPS
PAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
20 QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 15

Human CD80

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSC
25 GHNVSVEELA QTRIWQKEK KMVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS
IVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPSISDF
EIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAV
SSKLDNFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHFDDNLLPSWAIT
LISVNGIFVLCCLTYCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV

30 **SEQ ID NO. 16**

BsBA (CD80wa-Fc) DNA = mouse CD80w88a(aa1-235)-IgG2a(aa241-474)

Nucleotide sequence of mouse surrogate construct (BsBA; CD80wa-Fc):

ATGGCTTGCAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTC
 CAAGGCTCATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTGCTCTTTCACAAGTGTCTTCAGA
 TGTTGATGAACAACTGTCCAAGTCAGTGAAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCG
 TTACAACTCTCCTCATGAAGATGAGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACAT
 5 GACAAAGTGGTGCTGTCTGTCATTGCTGGGAAACTAAAAGTGGCGCCCGAGTAT
 AAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTCTTATCATCCTGGGCCTGG
 TCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCGTTCAAAAGAAGGAAAGAGGAA
 CGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAGCTGACTTCTC
 TACCCCCAACATAACTGAGTCTGGAAACCCATCTGCAGACACTAAAAGGATTAC
 10 CTGCTTTGCTTCCGGGGGTTTCCCAAAGCCTCGCTTCTCTTGGTTGGAAAATGG
 AAGAGAATTACCTGGCATCAATACGACAATTTCCAGGATCCTGAATCTGAATTG
 TACACCATTAGTAGCCAACACTAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGT
 GTCTCATTAATATGGAGATGCTCACGTGTCAGAGGACTTCACCTGGGAGCCCA
 GAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCT
 15 TGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGA
 TCTCCCTGAGCCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGAC
 CCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTACTCACAGCTCAG
 ACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTC
 CCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAA
 20 CAACAAAGCCCTCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGT
 CAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTA
 AGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTT
 ACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAA
 CCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAA
 25 AAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGCTCAGTGGTCCACGAGGG
 TCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAAGGCG
 GTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTGGGCCTGGGAAAGAGCTGGGTCTGGAGC
 CCGTAGCCCACCATCACCATCATCACTGA

SEQ ID NO. 17

30 **BsBA (CD80wa-Fc) Protein = mouse CD80w88a(aa1-235)-IgG2a(aa241-474)**

Translated protein sequence of mouse surrogate construct (BsBA; CD80wa-Fc):

MACNCQLMQDTPLLKFPCLILLFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYN
 SPHEDESEDRIYWQKHDKVVLVSVIAGKLKVAPEYKNRTLYDNNTYSLIILGLVLSDRG
 TYSCVVQKKERGTYEVKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPK
 35 PRFSWLENGRELPGINTTISQDPESELYTISSQLDFNTRNHTIKCLIKYGDAHVSED

FTWEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMLSPMVTCTVVVDVSE
DDPDVQISWVFNNEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKV
NNKALPAPIERTISKPKGQSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE
WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHN
5 HHTTKSFSRTPGKGGGGGGGGGGGPGKELGLEPVAHHHHHH

Other Embodiments

From the foregoing description, it will be apparent that variations and modifications may be made to the invention described herein to adopt it to various usages and
10 conditions. Such embodiments are also within the scope of the following claims.

The recitation of a listing of elements in any definition of a variable herein includes definitions of that variable as any single element or combination (or subcombination) of listed elements. The recitation of an embodiment herein includes that embodiment as any single embodiment or in combination with any other embodiments or portions
15 thereof.

All patents and publications mentioned in this specification are herein incorporated by reference to the same extent as if each independent patent and publication was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

20 References

The following documents are cited herein.

Allan, S.E., R. Broady, S. Gregori, M.E. Himmel, N. Locke, M.G. Roncarolo, R. Bacchetta, and M.K. Levings. 2008. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. Immunol Rev 223:391-421.

25 Anderson, B.E., J.M. McNiff, C. Matte, I. Athanasiadis, W.D. Shlomchik, and M.J. Shlomchik. 2004. Recipient CD4+ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease. Blood 104:1565-1573.

Anderson, M.S., and J.A. Bluestone. 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. Annu Rev Immunol 23:447-485.

- Barnden, M.J., J. Allison, W.R. Heath, and F.R. Carbone. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76:34-40.
- Baroja, M.L., L. Vijaykrishnan, E. Bettelli, P.J. Darlington, T.A. Chau, V. Ling, M. Collins, B.M. Carreno, J. Madrenas, and V.K. Kuchroo. 2002. Inhibition of CTLA-4 function by the regulatory subunit of serine/threonine phosphatase 2A. *J Immunol* 168:5070-5078.
- Bettini, M., A.L. Szymczak-Workman, K. Forbes, A.H. Castellaw, M. Selby, X. Pan, C.G. Drake, A.J. Korman, and D.A. Vignali. 2011. Cutting edge: accelerated autoimmune diabetes in the absence of LAG-3. *J Immunol* 187:3493-3498.
- Blair, P.J., J.L. Riley, B.L. Levine, K.P. Lee, N. Craighead, T. Francomano, S.J. Perfetto, G.S. Gray, B.M. Carreno, and C.H. June. 1998. CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J Immunol* 160:12-15.
- Bluestone, J.A., C.R. Mackay, J.J. O'Shea, and B. Stockinger. 2009. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 9:811-816.
- Caretto, D., S.D. Katzman, A.V. Villarino, E. Gallo, and A.K. Abbas. 2010. Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells. *J Immunol* 184:30-34.
- Chatenoud, L., E. Thervet, J. Primo, and J.F. Bach. 1994. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:123-127.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S.M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886.
- Chuang, E., T.S. Fisher, R.W. Morgan, M.D. Robbins, J.M. Duerr, M.G. Vander Heiden, J.P. Gardner, J.E. Hambor, M.J. Neveu, and C.B. Thompson. 2000. The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity* 13:313-322.
- Daniel, C., B. Weigmann, R. Bronson, and H. von Boehmer. 2011. Prevention of type 1 diabetes in mice by tolerogenic vaccination with a strong agonist insulin mimotope. *J Exp Med* 208:1501-1510.
- Fife, B.T., M.D. Griffin, A.K. Abbas, R.M. Locksley, and J.A. Bluestone. 2006. Inhibition of T cell activation and autoimmune diabetes using a B cell surface-linked CTLA-4 agonist. *J Clin Invest* 116:2252-2261.

- Gonzalez-Rey, E., A. Fernandez-Martin, A. Chorny, and M. Delgado. 2006. Vasoactive intestinal peptide induces CD4⁺,CD25⁺ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 54:864-876.
- Griffin, M.D., D.K. Hong, P.O. Holman, K.M. Lee, M.J. Whitters, S.M. O'Herrin, F. Fallarino, M. Collins, D.M. Segal, T.F. Gajewski, D.M. Kranz, and J.A. Bluestone. 2000. Blockade of T cell activation using a surface-linked single-chain antibody to CTLA-4 (CD152). *J Immunol* 164:4433-4442.
- Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M.L. Belladonna, R. Bianchi, M.C. Fioretti, and P. Puccetti. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3:1097-1101.
- Guntermann, C., and D.R. Alexander. 2002. CTLA-4 suppresses proximal TCR signaling in resting human CD4(+) T cells by inhibiting ZAP-70 Tyr(319) phosphorylation: a potential role for tyrosine phosphatases. *J Immunol* 168:4420-4429.
- Ise, W., M. Kohyama, K.M. Nutsch, H.M. Lee, A. Suri, E.R. Unanue, T.L. Murphy, and K.M. Murphy. 2010. CTLA-4 suppresses the pathogenicity of self antigen-specific T cells by cell-intrinsic and cell-extrinsic mechanisms. *Nat Immunol* 11:129-135.
- Jain, N., H. Nguyen, C. Chambers, and J. Kang. 2010. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1524-1528.
- Jiang, S., R.I. Lechler, and G. Lombardi. 2006. CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell therapy. *Expert review of clinical immunology* 2:387-392.
- Karandikar, N.J., C.L. Vanderlugt, T.L. Walunas, S.D. Miller, and J.A. Bluestone. 1996. CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease. *J Exp Med* 184:783-788.
- Karman, J., J.L. Jiang, N. Gumlaw, H. Zhao, J. Campos-Rivera, J. Sancho, J. Zhang, C. Jiang, S.H. Cheng, and Y. Zhu. 2012. Ligation of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 to the TCR inhibits T cell activation and directs differentiation into FOXP3⁺ regulatory T cells. *J Biol Chem*
- Kastner, L., D. Dwyer, and F.X. Qin. 2010. Synergistic effect of IL-6 and IL-4 in driving fate revision of natural Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 185:5778-5786.
- Kehrl, J.H., L.M. Wakefield, A.B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M.B. Sporn, and A.S. Fauci. 1986. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 163:1037-1050.

- Koenen, H.J., R.L. Smeets, P.M. Vink, E. van Rijssen, A.M. Boots, and I. Joosten. 2008. Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112:2340-2352.
- 5 Krummel, M.F., and J.P. Allison. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182:459-465.
- Krummel, M.F., and J.P. Allison. 1996. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* 183:2533-2540.
- Lenschow, D.J., S.C. Ho, H. Sattar, L. Rhee, G. Gray, N. Nabavi, K.C. Herold, and J.A. Bluestone. 1995. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody
10 treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* 181:1145-1155.
- Linsley, P.S., and P. Golstein. 1996. Lymphocyte activation: T-cell regulation by CTLA-4. *Curr Biol* 6:398-400.
- Linsley, P.S., J.L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J.A. Ledbetter, and R. Peach. 1994. Human
15 B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1:793-801.
- Marie, J.C., J.J. Letterio, M. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 201:1061-1067.
- 20 Masteller, E.L., M.R. Warner, Q. Tang, K.V. Tarbell, H. McDevitt, and J.A. Bluestone. 2005. Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from nonobese diabetic mice. *J Immunol* 175:3053-3059.
- McDevitt, H., S. Singer, and R. Tisch. 1996. The role of MHC class II genes in susceptibility and resistance to type I diabetes mellitus in the NOD mouse. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 28:287-288.
25
- Murai, M., O. Turovskaya, G. Kim, R. Madan, C.L. Karp, H. Cheroutre, and M. Kronenberg. 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 10:1178-1184.
- Nishio, J., M. Feuerer, J. Wong, D. Mathis, and C. Benoist. 2010. Anti-CD3 therapy permits
30 regulatory T cells to surmount T cell receptor-specified peripheral niche constraints. *J Exp Med* 207:1879-1889.

Ohata, J., T. Miura, T.A. Johnson, S. Hori, S.F. Ziegler, and H. Kohsaka. 2007. Enhanced efficacy of regulatory T cell transfer against increasing resistance, by elevated Foxp3 expression induced in arthritic murine hosts. *Arthritis Rheum* 56:2947-2956.

Onodera, T., M.H. Jang, Z. Guo, M. Yamasaki, T. Hirata, Z. Bai, N.M. Tsuji, D. Nagakubo, O. Yoshie, S. Sakaguchi, O. Takikawa, and M. Miyasaka. 2009. Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions. *J Immunol* 183:5608-5614.

Paterson, A.M., and A.H. Sharpe. 2010. Taming tissue-specific T cells: CTLA-4 reins in self-reactive T cells. *Nat Immunol* 11:109-111.

10 Pentcheva-Hoang, T., J.G. Egen, K. Wojnoonski, and J.P. Allison. 2004. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21:401-413.

Pontow, S.E., V. Kery, and P.D. Stahl. 1992. Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 137B:221-244.

Qu, H.Q., J.P. Bradfield, S.F. Grant, H. Hakonarson, and C. Polychronakos. 2009. Remapping the type I diabetes association of the CTLA4 locus. *Genes and immunity* 10 Suppl 1:S27-32.

15 Riley, J.L., C.H. June, and B.R. Blazar. 2009. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity* 30:656-665.

Roncarolo, M.G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M.K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28-50.

20 Roopenian, D.C., and S. Akilesh. 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7:715-725.

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.

25 Salomon, B., D.J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J.A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.

Shoda, L.K., D.L. Young, S. Ramanujan, C.C. Whiting, M.A. Atkinson, J.A. Bluestone, G.S. Eisenbarth, D. Mathis, A.A. Rossini, S.E. Campbell, R. Kahn, and H.T. Kruwel. 2005. A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity* 23:115-126.

30

- Simon, G., M. Parker, V. Ramiya, C. Wasserfall, Y. Huang, D. Bresson, R.F. Schwartz, M. Campbell-Thompson, L. Tenace, T. Brusko, S. Xue, A. Scaria, M. Lukason, S. Eisenbeis, J. Williams, M. Clare-Salzler, D. Schatz, B. Kaplan, M. Von Herrath, K. Womer, and M.A. Atkinson. 2008. Murine antithymocyte globulin therapy alters disease progression in NOD mice by a time-dependent induction of immunoregulation. *Diabetes* 57:405-414.
- 5 Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
- Tang, Q., J.A. Bluestone, and S.M. Kang. 2012. CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell therapy in transplantation. *Journal of molecular cell biology* 4:11-21.
- 10 Tang, Q., K.J. Henriksen, M. Bi, E.B. Finger, G. Szot, J. Ye, E.L. Masteller, H. McDavitt, M. Bonyhadi, and J.A. Bluestone. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199:1455-1465.
- Tang, Q., K.J. Henriksen, E.K. Boden, A.J. Tooley, J. Ye, S.K. Subudhi, X.X. Zheng, T.B. Strom, and J.A. Bluestone. 2003. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 171:3348-3352.
- 15 Tarbell, K.V., L. Petit, X. Zuo, P. Toy, X. Luo, A. Mqadmi, H. Yang, M. Suthanthiran, S. Mojsos, and R.M. Steinman. 2007. Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med* 204:191-201.
- 20 Taylor, P.A., C.J. Lees, and B.R. Blazar. 2002. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 99:3493-3499.
- Tivol, E.A., F. Borriello, A.N. Schweitzer, W.P. Lynch, J.A. Bluestone, and A.H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541-547.
- 25 Tsunawaki, S., M. Sporn, A. Ding, and C. Nathan. 1988. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 334:260-262.
- Ueda, H., J.M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D.B. Rainbow, K.M. Hunter, A.N. Smith, G. Di Genova, M.H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R.C. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H.E. Rance, V. Everett, L.J. Smink, A.C. Lam, H.J. Cordell, N.M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J.F. Hess, M.L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadia, R. Nithiyananthan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K.M. Gillespie, D.E. Undlien, K.S. Ronningen, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D.A. Savage, A.P. Maxwell, D.J. Carson, C.C. Patterson, J.A. Franklyn,
- 30

- D.G. Clayton, L.B. Peterson, L.S. Wicker, J.A. Todd, and S.C. Gough. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423:506-511.
- Vergani, A., F. D'Addio, M. Jurewicz, A. Petrelli, T. Watanabe, K. Liu, K. Law, C. Schuetz, M. Carvello, E. Orsenigo, S. Deng, S.J. Rodig, J.M. Ansari, C. Staudacher, R. Abdi, J. Williams, J. Markmann, M. Atkinson, M.H. Sayegh, and P. Fiorina. 2010. A novel clinically relevant strategy to abrogate autoimmunity and regulate alloimmunity in NOD mice. *Diabetes* 59:2253-2264.
- Wahl, S.M., N. McCartney-Francis, J.B. Allen, E.B. Dougherty, and S.F. Dougherty. 1990. Macrophage production of TGF-beta and regulation by TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci* 593:188-196.
- Walunas, T.L., C.Y. Bakker, and J.A. Bluestone. 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 183:2541-2550.
- Walunas, T.L., and J.A. Bluestone. 1998. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J Immunol* 160:3855-3860.
- Walunas, T.L., D.J. Lenschow, C.Y. Bakker, P.S. Linsley, G.J. Freeman, J.M. Green, C.B. Thompson, and J.A. Bluestone. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405-413.
- Waterhouse, P., J.M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K.P. Lee, C.B. Thompson, H. Griesser, and T.W. Mak. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* 270:985-988.
- Weigel, P.H. 1994. Galactosyl and N-acetylgalactosaminyl homeostasis: a function for mammalian asialoglycoprotein receptors. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 16:519-524.
- Wicker, L.S., J.A. Todd, and L.B. Peterson. 1995. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* 13:179-200.
- Yamagiwa, S., J.D. Gray, S. Hashimoto, and D.A. Horwitz. 2001. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 166:7282-7289.
- Zhao, D., C. Zhang, T. Yi, C.L. Lin, I. Todorov, F. Kandeel, S. Forman, and D. Zeng. 2008. In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease. *Blood* 112:2129-2138.

Zheng, S.G., J.D. Gray, K. Ohtsuka, S. Yamagiwa, and D.A. Horwitz. 2002. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. J Immunol 169:4183-4189.

5 Zhou, X., S. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, and J.A. Bluestone. 2009a. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. Curr Opin Immunol 21:281-285.

Zhou, X., S.L. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martinez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J.A. Bluestone. 2009b. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. Nat Immunol 10:1000-1007.

Claims

1. Use of a bispecific biologic comprising a ligand specific for CTLA-4 and a ligand specific for a pMHC complex according to any one of claims 1 to 14 for the tolerisation of a T-cell by contacting said T-cell with an antigen-presenting cell which is presenting a peptide derived from said antigen complexed to a MHC molecule and said bispecific biologic.
2. Use of a bispecific biologic comprising a ligand specific for CTLA-4 and a ligand specific for a pMHC complex according to any one of claims 1 to 14 in the treatment of a disease selected from an autoimmune disease and transplant rejection.
3. Use according to claim 2, wherein the autoimmune disease is type 1 diabetes (T1D).
4. Use according to to any preceding claim, wherein the ligand specific for CTLA-4 is selected from an antibody specific for CTLA-4, and CD80 (B7-1) or CD86 (B7-2).
5. Use according to to any preceding claim, wherein the ligand specific for the pMHC complex is selected from an anti-MHC antibody and LAG-3.
6. Use according to any preceding claim, wherein the ligand specific for CTLA-4 and the ligand specific for the pMHC complex are spaced apart by a linker.
7. Use according to claim 6, wherein the linker is one or more of a polyamino acid sequence and an antibody Fc domain.
8. Use according to claim 7, wherein the polyamino acid sequence is G9 (Gly-9).
9. Use according to claim 4, wherein the ligand specific for CTLA-4 is CD80.
10. Use according to claim 9, wherein CD80 is mutated to increase specificity for CTLA-4.
11. Use according to claim 10, wherein CD80 is human CD80 comprising at least one of mutations W84A, K71G, K71V, S109G, R123S, R123D, G124L, S190A, S201A, R63A, M81A, N97A and E196A.
12. Use according to claim 11, wherein CD80 comprises the mutation W84A or E196A of human CD80.

13. Use according to claim 5, wherein the ligand specific for the MHC complex is LAG-3.
14. Use according to claim 13, wherein LAG-3 is mutated to increase specificity for pMHCII.
- 5 15. Use according to claim 14, wherein LAG-3 is human LAG-3 comprising at least one of mutations R73E, R75A, R75E and R76E .
16. Use according to claim 15, wherein LAG-3 comprises the mutation R75A or R75E.
17. A bispecific biologic comprising a ligand specific for CTLA-4 and a ligand
10 specific for a pMHC complex.
18. A bispecific biologic according to claim 17, wherein the ligand specific for CTLA-4 is selected from an antibody specific for CTLA-4, and CD80 (B7-1) or CD86 (B7-2).
19. A bispecific biologic according to claim 17 or claim 18, wherein the ligand
15 specific for the pMHC complex is selected from an anti-MHC antibody and LAG-3.
20. A bispecific biologic according to any preceding claim, wherein the ligand specific for CTLA-4 and the ligand specific for the pMHC complex are spaced apart by a linker.
21. A bispecific biologic according to claim 20, wherein the linker is one or more
20 of a polyamino acid sequence and an antibody Fc domain.
22. A bispecific biologic according to claim 21, wherein the polyamino acid sequence is G9 (Gly-9).
23. A bispecific biologic according to claim 18, wherein the ligand specific for CTLA-4 is CD80.
- 25 24. A bispecific biologic according to claim 23, wherein CD80 is mutated to increase specificity for CTLA-4.
25. A bispecific biologic according to claim 24, wherein CD80 is human CD80 comprising at least one of mutations W84A, K71G, K71V, S109G, R123S, R123D, G124L, S190A, S201A, R63A, M81A, N97A and E196A .

26. A bispecific biologic according to claim 25, wherein CD80 comprises the mutation W84A or E196A of human CD80.
27. A bispecific biologic according to claim 19, wherein the ligand specific for the MHC complex is LAG-3.
- 5 28. A bispecific biologic according to claim 27, wherein LAG-3 is mutated to increase specificity for pMHCII.
29. A bispecific biologic according to claim 28, wherein LAG-3 is human LAG-3 comprising at least one of mutations R73E, R75A, R75E and R76E .
30. A bispecific biologic according to claim 29, wherein LAG-3 comprises the
10 mutation R75A or R75E.
31. A method of tolerising a T-cell to an antigen, comprising contacting said T-cell with an antigen-presenting cell which is presenting a peptide derived from said antigen complexed to a MHC molecule and a bispecific biologic according to any one of claims 17 to 30.
- 15 32. A method for treating a subject suffering from a condition selected from an autoimmune disease or transplant rejection, comprising the steps of administering to a subject in need thereof a bispecific biologic comprising a ligand specific for CTLA-4 and a ligand specific for a pMHC complex according to any one of claims 17 to 30.
33. A method according to claim 32, wherein the bispecific biologic is
20 administered in combination with a further immune suppressant or modulator.
34. A method according to claim 32 or claim 33, wherein the autoimmune disease is selected from type 1 diabetes (T1D), Systemic Lupus Erythematosus (SLE), Rheumatoid Arthritis (RA) , inflammatory bowel disease (IBD), ulcerative colitis (UC), Crohn's disease (CD), multiple sclerosis (MS), scleroderma, pemphigus
25 vulgaris (PV), psoriasis, atopic dermatitis, celiac disease, Chronic Obstructive Lung disease, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease (thyroid). Sjogren's syndrome, Guillain-Barre syndrome, Goodpasture's syndrome, Addison's disease, Wegener's granulomatosis, primary biliary sclerosis, sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis, polymyalgia rheumatica, Raynaud's phenomenon, temporal arteritis, giant
30 cell arteritis, autoimmune hemolytic anemia, pernicious anemia, polyarteritis nodosa. Behcet's disease, primary biliary cirrhosis, uveitis, myocarditis, rheumatic fever,

WO 2013/003761

PCT/US2012/045017

ankylosing spondylitis, glomerulonephritis, sarcoidosis, dermatomyositis, myasthenia gravis, polymyositis, alopecia areata, and vitiligo.

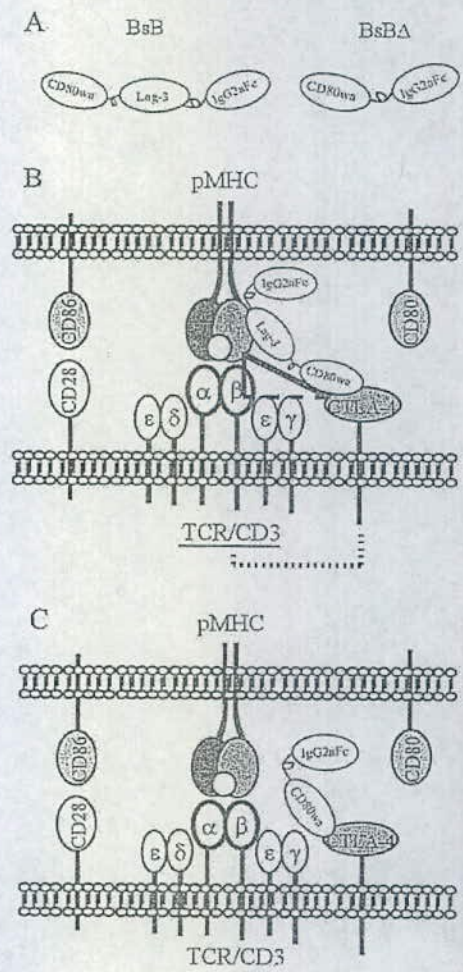


Figure 1

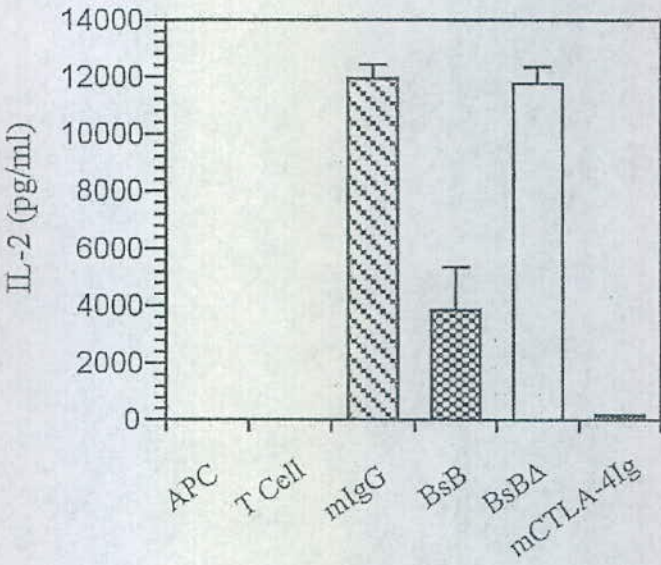
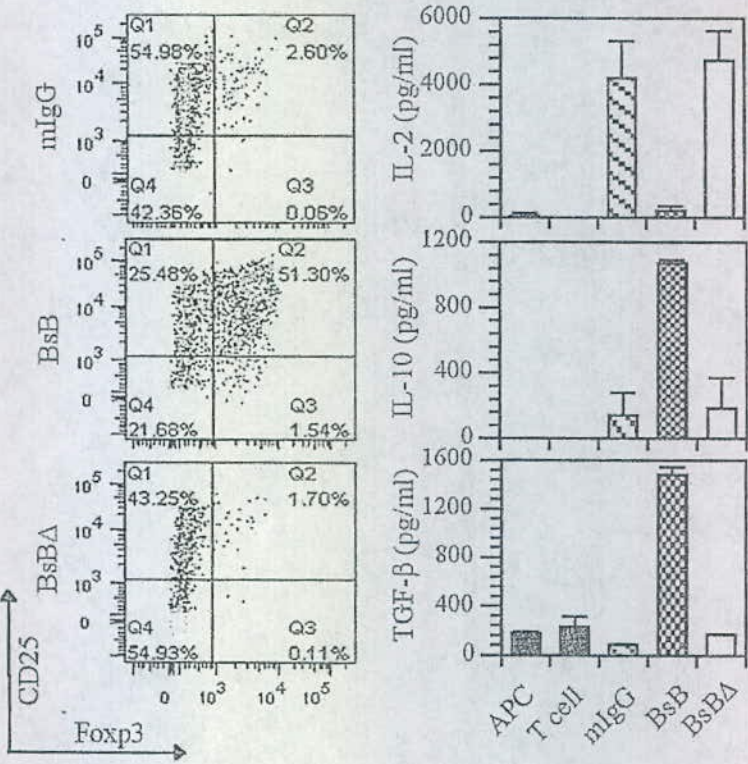


Figure 2

95

A



B

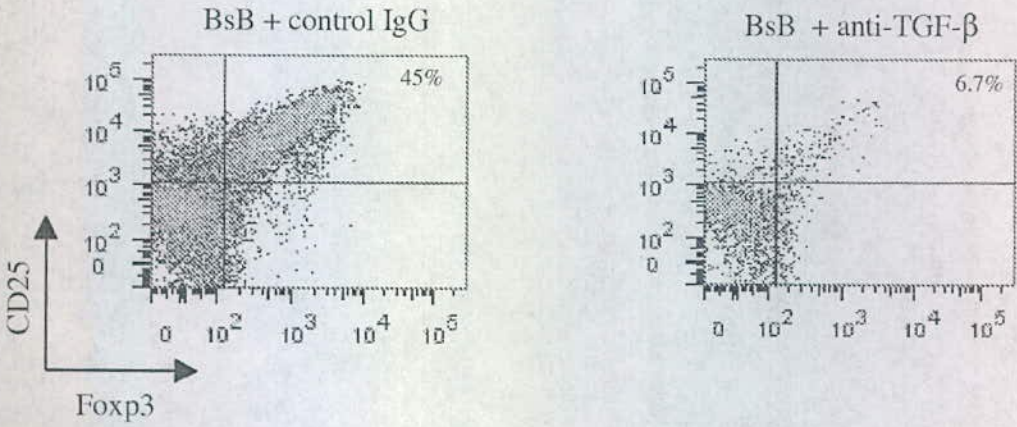


Figure 3

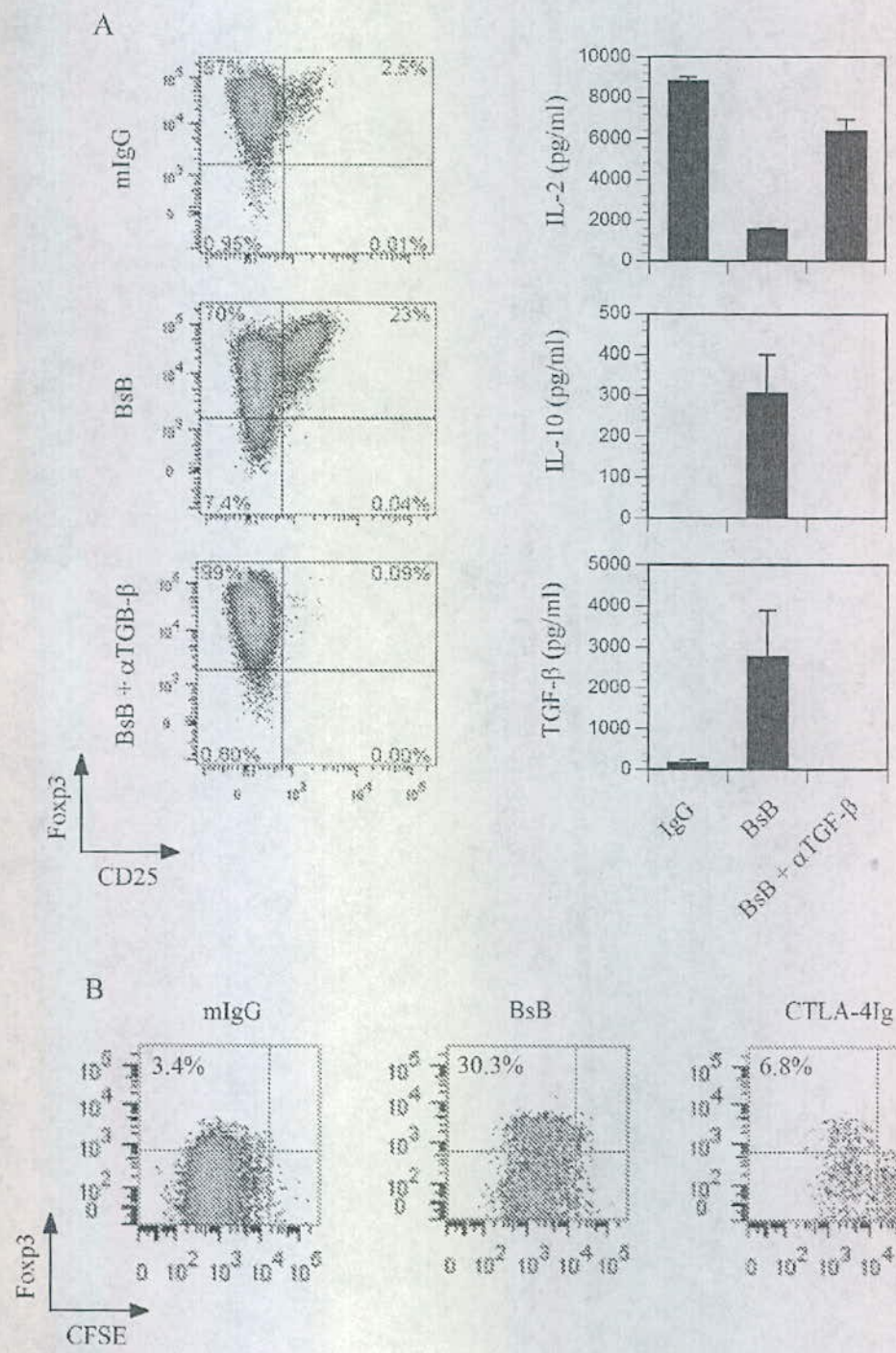


Figure 4

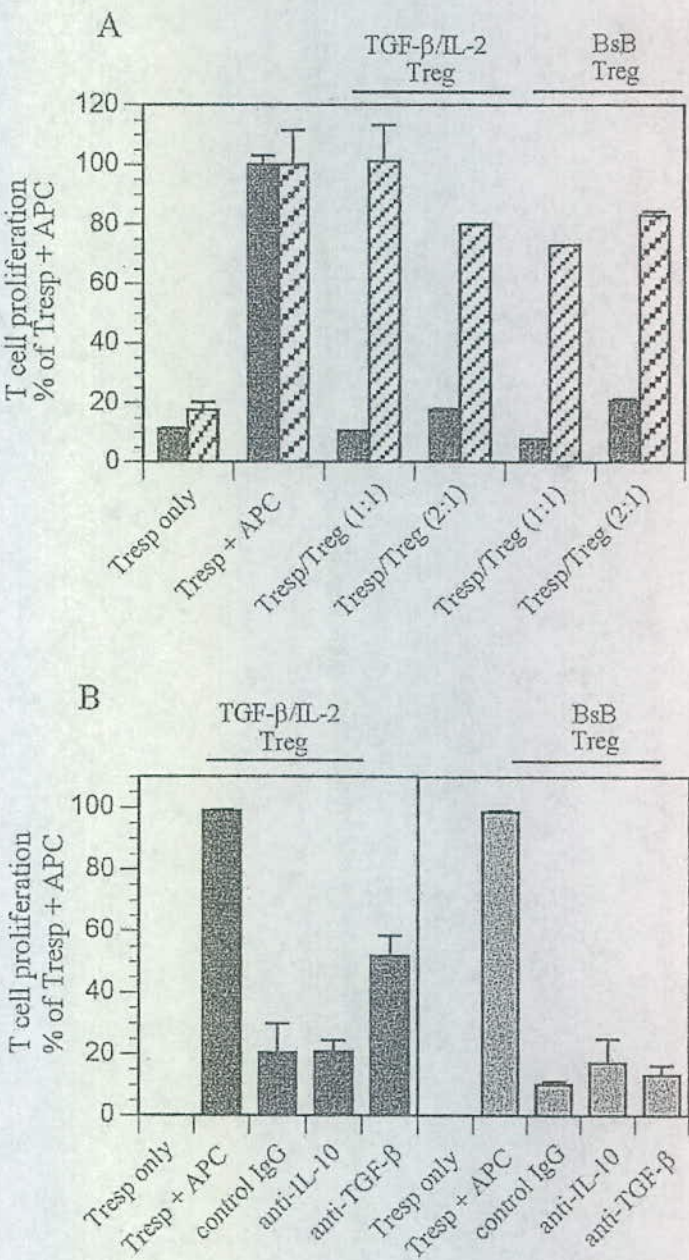


Figure 5

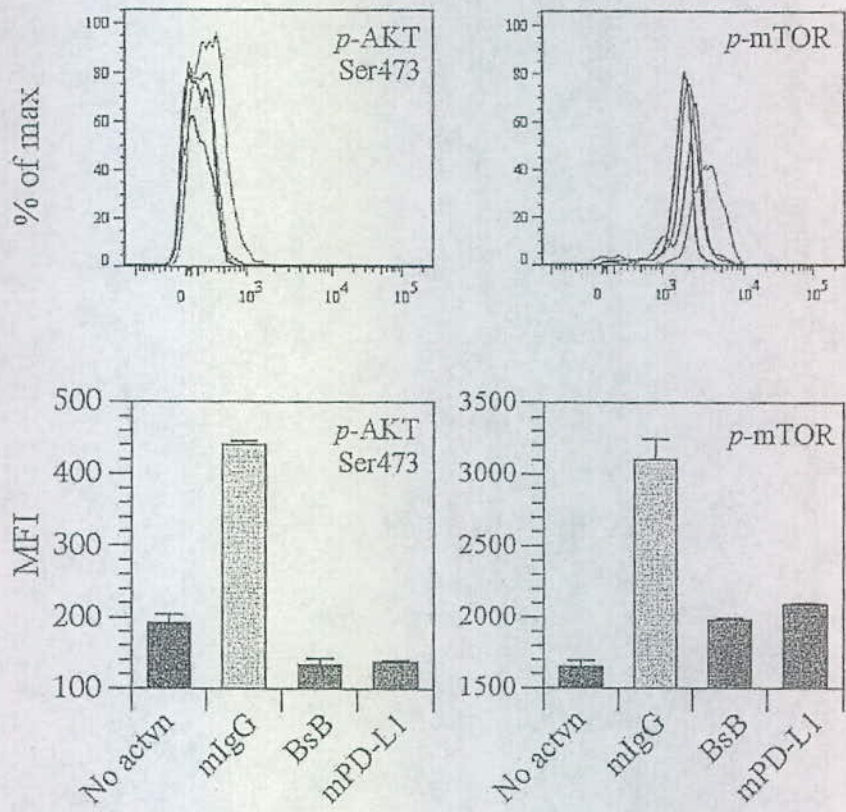


Figure 6

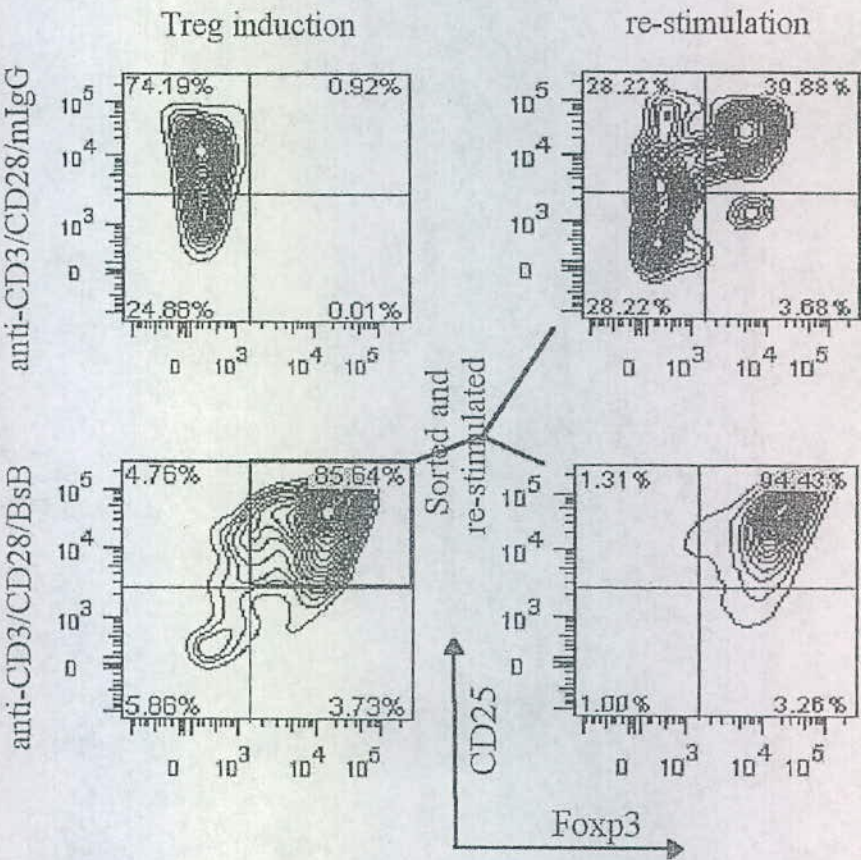


Figure 7

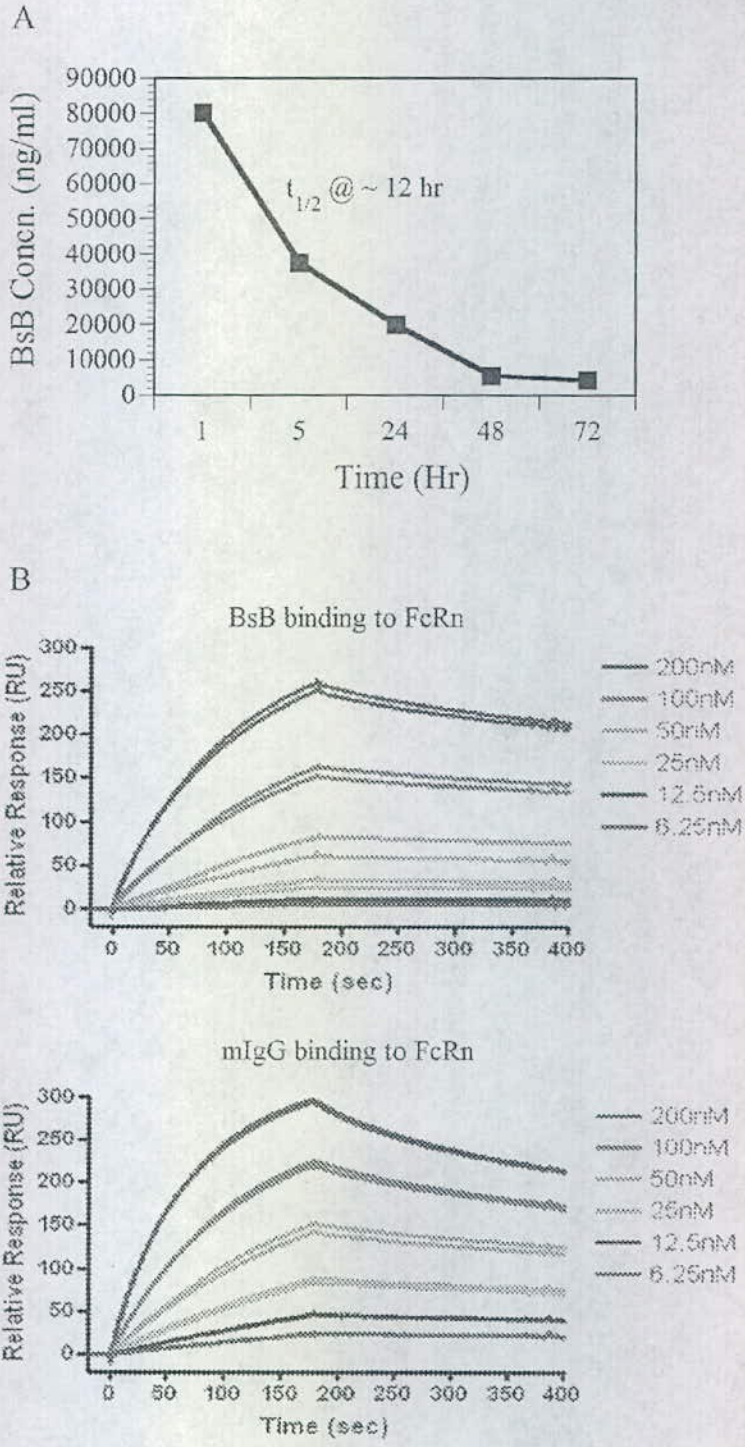


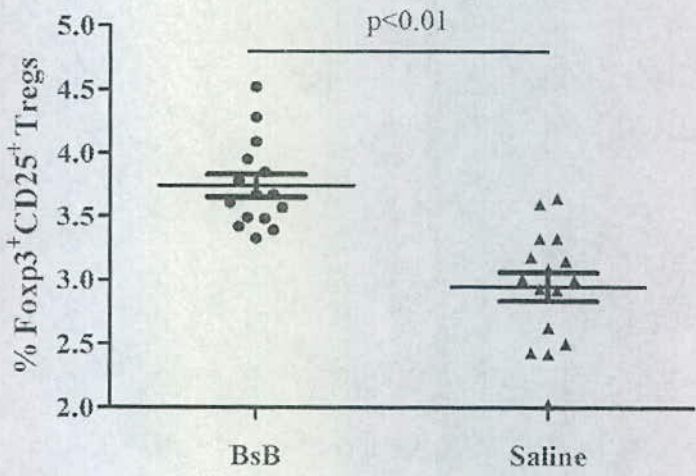
Figure 8

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

Sugars/BsB	Fuc	GlcNAc	Gal	Man	Sialic acid	Sialic acid/Gal ratio
Mol/Mol	8.0 ± 0.6	37.1 ± 2.2	28.5 ± 1.1	36.8±2.6	19.3 ± 0.7	0.68

Figure 9

A



B

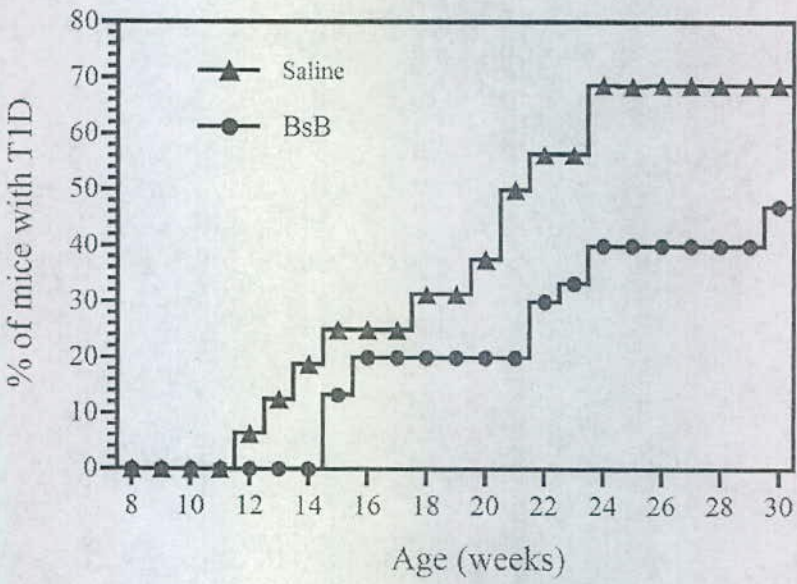
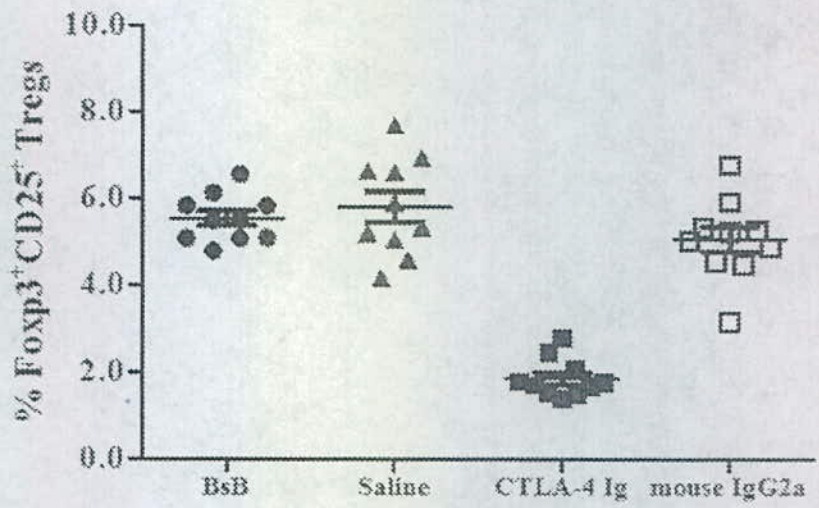


Figure 10

A



B

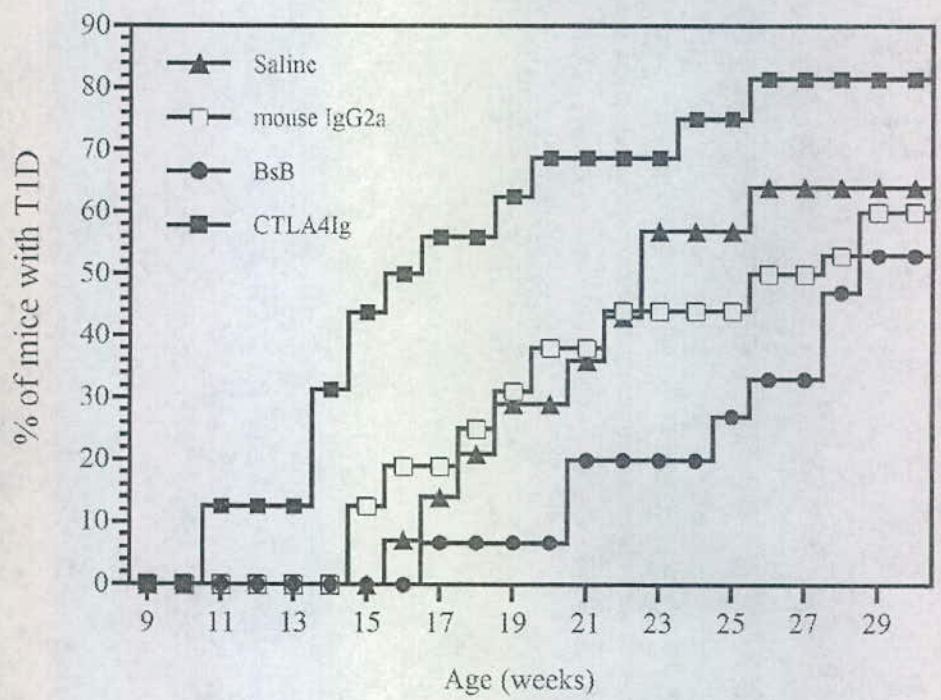


Figure 11

raf

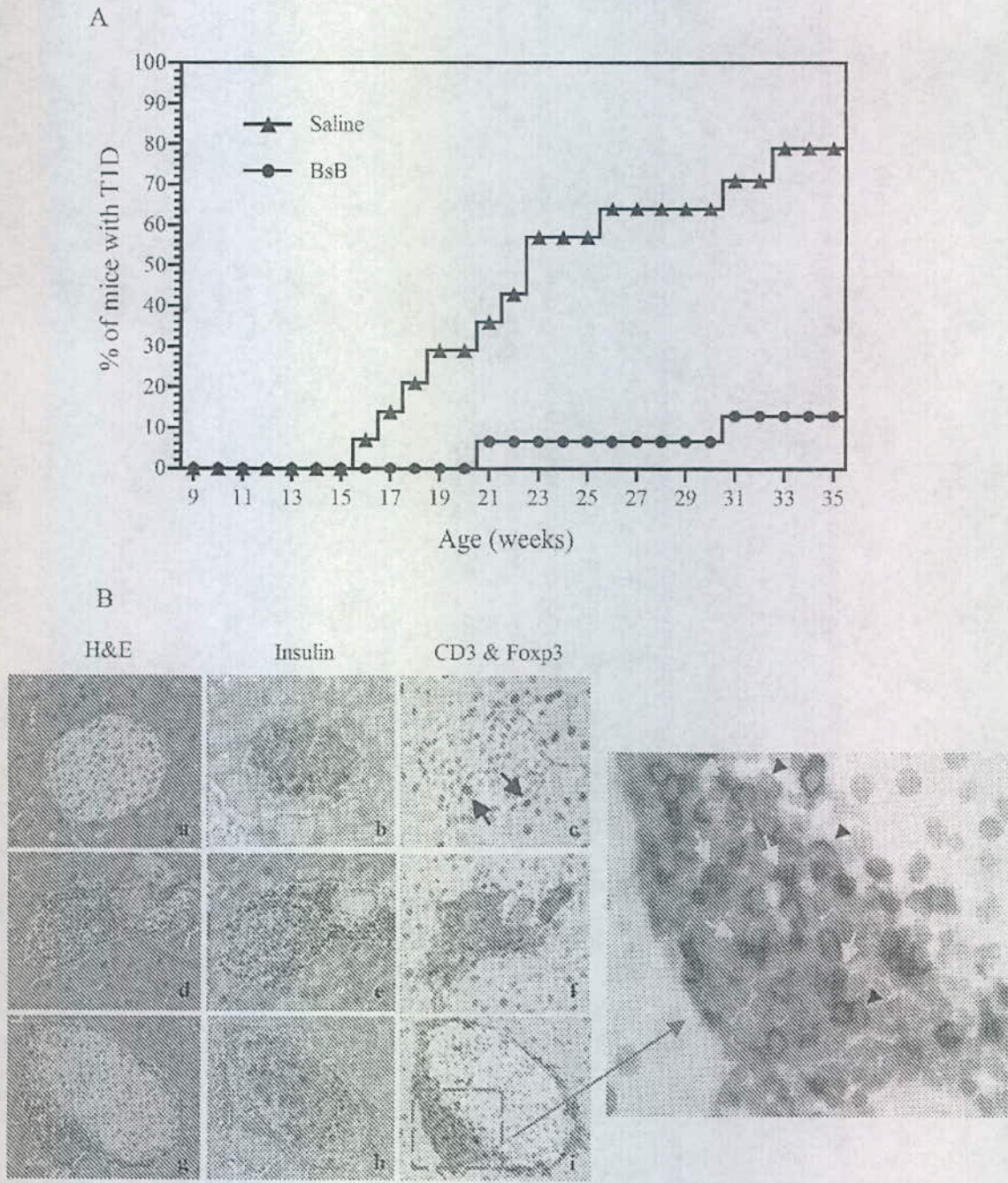


Figure 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/045017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395 (2012.01) USPC - 424/136.1 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) IPC(8) - A61K 39/395; C07K 16/42; C12P 21/08 (2012.01) USPC - 424/136.1, 144.1; 435/327; 530/388.75 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 practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/0150892 A1 (THUDIUM et al) 23 June 2011 (23.06.2011) entire document	17-19, 27

Y		23-26, 28-30
Y	US 2007/0148162 A1 (BHARDWAJ et al) 28 June 2007 (26.06.2008) entire document	23-26
Y	FARGEAS, C. et al. "Identification of Residues in the V Domain of CD80 (B7-1) Implicated in Functional Interactions with CD28 and CTLA4," (September 1995) J. Exp. Med. 182:667-675. entire document	24-26
Y	HUARD, B. et al. "Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein," (May 1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5744-5749. entire document	28-30
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* 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 application or patent 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 26 September 2012		Date of mailing of the international search report 23 OCT 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/045017

Box No. 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. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 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.: 1-16, 20-22, 31-34
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. 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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INHIBIDORES DE LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS T

Referencia cruzada con Solicitud Relacionada

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional U.S. siguiente No: 61/503.282, presentada el 30 de junio, 2011, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente memoria por referencia.

Antecedentes de la Invención

La terapia celular que usa Tregs recién aislados, expandidos *ex vivo* o inducidos *in vitro* en modelos de enfermedades autoinmunes o trasplantes de órganos ha demostrado que la transferencia adoptiva de Tregs puede restaurar el equilibrio de Tregs frente a células T efectoras, controlando de esta manera la autoinmunidad asociada con estas enfermedades (Allan et al., (2008) *Immunol. Rev.* 223:391-421; Jiang et al., (2006) *Expert review of clinical immunology* 2:387-392; Riley et al., (2009) *Immunity* 30:656-665 ; Tang et al., (2012) *Journal of molecular cell biology* 4:11-21). Sin embargo, el uso de transferencia adoptiva como una estrategia terapéutica presenta varios retos para su traslado a la clínica. El número de Tregs autólogos que puede aislarse de la sangre periférica de un sujeto humano es limitado y una expansión extensa *ex vivo* de los Tregs puede alterar su funcionalidad y/o pureza. Como los Tregs aislados son policlonales, pueden ejercer una función inmunosupresora generalizada en células T efectoras no dianas. De forma importante, la plasticidad de los Tregs plantea un reto significativo (Bluestone et al., (2009) *Nat Rev Immunol* 9:811-816; Zhou et al., (2009a) *Curr Opin Immunol* 21:281-285), ya que los Tregs transferidos de manera adoptiva pueden perder la expresión de Foxp3 y rediferenciarse en células Th17 (Koenen et al., (2008) *Blood* 112:2340-2352.) o células T de memoria patogénicas (Zhou et al., (2009b) *Nat Immunol* 10:1000-1007) lo que eleva el riesgo de agravar la autoinmunidad o inflamación.

Un agente terapéutico que induce la generación de Tregs de una manera específica de antígeno *in situ* tendría ventajas sobre la terapia de células Treg adoptiva. El antígeno 4 asociado con linfocitos T citotóxicos (CTLA-4; CD 152) es un regulador negativo bien establecido de la respuesta de células T, es importante para el mantenimiento de la homeostasis de las células T y la auto-tolerancia. CTLA-4 es homólogo a la molécula co-estimuladora CD28 y comparte los mismos ligandos, CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC). Sin embargo, la unión diferencial de CD80/CD86 en APC respecto a CD28 y CTLA-4 en células T efectoras da

lugar a resultados opuestos, con CD28 desencadenando la activación de las células T y CTLA-4 causando la inhibición de las células T.

Como CD28 se expresa constitutivamente en las células T y la expresión de CTLA-4 sólo se induce después de la activación de las células T, con un pico 2-3 días después (Jago et al., (2004) *Clinical & Experimental Immunology*, 136: 463-471), la activación extensa de las células T habría ocurrido antes de la activación de CTLA-4. Por lo tanto, el papel principal de CTLA-4 es actuar como una defensa frente a una respuesta excesiva de células T en lugar de inhibir la activación de las células T. Sin embargo, la activación temprana de CTLA-4 por su ligando y su entrecruzamiento posterior al receptor de la célula T (TCR) puede disminuir prematuramente la señalización del TCR, causando la inhibición de las células T y una menor capacidad de respuesta o anergia. Este concepto se ha validado experimentalmente usando una variedad de métodos, incluyendo lo siguiente: (i) entrecruzar anticuerpos activadores de células T (anti-CD3/anti-CD28) usando un anticuerpo agonista anti-CTLA-4 por co-inmovilización en un lecho o mediante un anticuerpo secundario (Blair et al., (1998) *J. Immunol.* 160: 12-15; Krummel y Allison, (1996) *J Exp Med* 183:2533-2540; Walunas et al., (1996) *J. Exp. Med.* 183:2541-2550); (ii) preparar por ingeniería molecular un scFv agonista unido a superficie frente a CTLA-4 en una APC (Fife et al., (2006) *J. Clin. Invest.* 116(8):2252- 61; Griffin et al., (2001) *J. Immunol. Methods.* 248(1-2):77-90; Griffin et al., (2000) *J. Immunol.* 164(9):4433-42); y (iii) entrecruzar químicamente anticuerpos que reconocen antígenos específicos en una APC con un anticuerpo agonista anti-CTLA-4 (Li et al., (2007). *J. Immunol.* 179(8):5191-203; Rao et al., (2001) *Clin. Immunol.* 101(2):136-45; Vasu et al., (2004) *J. Immunol.* 173(4):2866- 76).

La restauración del equilibrio de Tregs frente a células T efectoras es un medio prometedor para tratar enfermedades autoinmunes. Sin embargo, la terapia celular que implica la transferencia de Tregs tiene determinadas limitaciones. De acuerdo con esto, se requieren urgentemente agentes terapéuticos que puedan inducir la generación de Tregs (por ejemplo, CTLA-4) de una manera específica de antígeno para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Resumen de la Invención

La presente invención se refiere a ligandos que entrecruzan el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) activado por ligando con el receptor de células T (TCR) durante la fase temprana de la activación de las células T y de esta manera atenúan la señalización del TCR, dando lugar a la inhibición de las células T. Para desarrollar un agente que pueda inhibir la activación de las células T, se generó una proteína de fusión biespecífica que comprende restos que se unen selectivamente y activan CTLA-4 y lo co-ligan al TCR. A diferencia de las

estrategias de la técnica anterior, la proteína de fusión biespecífica se preparó por ingeniería para entrecruzar MHC con CTLA-4; ambos se unen al TCR, generando el complejo trimolecular CTLA-4/MHCII/TCR en las sinapsis inmunes.

El entrecruzamiento del antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) activado por ligando con el TCR con una proteína de fusión biespecífica (BsB) que comprende un CD80 de ratón mutante y el antígeno 3 de activación de linfocitos en un MLR alogénico atenuó la señalización de TCR y dirigió la diferenciación de las células T hacia células T reguladoras Foxp3⁺ (Tregs). Como se describe en la presente memoria, los Tregs específicos de antígeno también pueden inducirse en un entorno específico de antígeno. El tratamiento de ratones diabéticos no obesos (NOD) con un curso corto de BsB retrasó moderadamente el inicio de la diabetes autoinmune de tipo 1 (T1D) con un incremento transitorio de Tregs en la sangre. Sin embargo, un curso más largo de tratamiento de animales NOD con BsB retrasó significativamente el inicio de enfermedad así como redujo la incidencia de animales que presentaban diabetes. El análisis histopatológico de los páncreas de ratones tratados con BsB que permanecieron no diabéticos reveló la presencia de Tregs que se entremezclaron con otras células T CD3⁺ y leucocitos distintos de células T alrededor de los islotes. Esta peri-insulitis estaba asociada con una insulitis invasiva mínima y sin destrucción notable de las células β productoras de insulina. Así, las proteínas bifuncionales capaces de unir CTLA-4 y MHCII y co-ligarlo indirectamente con el TCR pueden inducir Tregs específicos de antígeno in vivo para proteger a los ratones de T1D u otras enfermedades autoinmunes.

En particular, la invención describe proteínas de fusión biespecíficas que entrecruzan CTLA-4 con el complejo pMHCII. *Por ejemplo*, se describe una proteína de fusión biespecífica que comprende un CD80 de ratón mutante (CD80w88a) y antígeno 3 de activación de linfocitos (LAG-3) que se prepara por ingeniería para, simultáneamente, activar CTLA-4 y entrecruzarlo con el TCR a través de pMHCII. En un primer aspecto, por lo tanto, se proporciona un agente biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC.

En un aspecto, la invención proporciona un agente biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC. El agente biológico biespecífico según la invención es capaz de entrecruzar CTLA-4, presente en las células T, con el complejo de péptido MHC (pMHC) en células presentadoras de antígeno (APC). El complejo del péptido MHC se une por el receptor de células T cognado (TCR) en células T, lo que significa que el agente biológico según la invención da lugar a un complejo tripartito CTLA-4/MHC/TCR.

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

En el agente biológico biespecífico según la invención, el ligando específico para CTLA-4 y el ligando específico para el complejo pMHC están espaciados preferiblemente por un conector.

El conector puede tener la forma de una o más de una secuencia de poliaminoácido y un dominio Fc de anticuerpo. Una secuencia adecuada de poliaminoácido es G9 (Gly-9).

En varias realizaciones de los aspectos descritos en la presente memoria, el ligando específico para CTLA-4 es CD80, o un mutante de éste que está mutado para incrementar la especificidad para CTLA-4 sobre CD28. En una realización, el CD80 mutado comprende una o más mutaciones seleccionadas de W88A, K75G, K75V, S112G, R126S, R126D, G127L, S193A, y S204A, usando numeración de secuencia en el precursor de CD80 de ratón, o sus equivalentes CD80 humanos (W84A, K71G, K71V, S109G, R123S, R123D, G124L, S190A, and S201A) y además R63A, M81A, N97A, E196A.

En una realización, el agente biológico biespecífico comprende CD80, que comprende la mutación W84A (humano) o W88A (de ratón).

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

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

El gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3), un ligando natural de MHCII, se seleccionó como el otro componente de unión de la proteína de fusión biespecífica (Baixeras et al., (1992) *J. Exp. Med.* 176:327- 337; Triebel et al., (1990) *J. Exp. Med.* 171:1393-1405). Mostramos que una proteína de fusión con dicha bi-funcionalidad inhibe eficazmente la activación de las células T y estimula la producción de las citoquinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF- β . De forma más importante, esta proteína de fusión biespecífica también dirigía la diferenciación de las células T en Tregs Foxp3⁺ altamente supresores. Esto no ocurría cuando se usó el inhibidor co-estimulador CTLA-4lg bien establecido en su lugar (Bluestone et al., (2006) *Immunity* 24:233-238; Linsley y Nadler (2009) *Immunol. Rev.* 229:307-321). Por lo tanto, la activación temprana de CTLA-4 y el entrecruzamiento de CTLA-4 con el TCR durante la activación de las células T podrían influir activamente en la diferenciación de las células T. Dichas proteínas de fusión biespecíficas podrían representar así una nueva clase de agentes biológicos que podrían usarse para controlar las respuestas excesivas de las células T en las enfermedades autoinmunes.

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

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

Por ejemplo, la enfermedad autoinmune es diabetes tipo 1 (T1D, Lupus Eritematoso Sistémico (SLE), Artritis Reumatoide (RA) y enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) (incluyendo colitis ulcerosa (UC) y enfermedad de Crohn (CD)), esclerosis múltiple (MS), escleroderma, y otras enfermedades y trastornos, tales como PV (pénfigo vulgar), psoriasis, dermatitis atópica, enfermedad celiaca, enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves (tiroides), síndrome de Sjogren, síndrome de Guillain-Barre, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Addison, granulomatosis de Wegener, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmune, polimialgia reumática. fenómeno de Raynaud, arteritis temporal, arteritis de células gigantes, anemia hemolítica autoinmune, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa. enfermedad de Behcet, cirrosis biliar primaria, uveitis,

miocarditis, fiebre reumática, espondilitis anquilosante, glomerulonefritis, sarcoidosis, dermatomiositis, miastenia grave, polimiositis, alopecia areata, y vitiligo.

En un cuarto aspecto, se proporciona un método para inducir tolerancia de una célula T a un antígeno, que comprende poner en contacto dicha célula T con una célula presentadora de antígeno que está presentando un péptido derivado de dicho antígeno formando un complejo con una molécula MHC y un agente biológico biespecífico según el primer aspecto de la invención.

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

Por ejemplo, la enfermedad autoinmune es diabetes Tipo 1 (T1D).

15 Descripción de las Figuras

Figura 1. Diseños de BsB y BsBA. (A) Dibujos esquemáticos del BsB (agente biológico biespecífico) y proteínas de fusión BsBA. (B) Dibujo esquemático de pMHCII, el TCR y moléculas co-estimuladoras en la sinapsis inmune, así como el esquema propuesto para el entrecruzamiento mediado por BsB de CTLA-4 con el TCR a través del complejo trimolecular CTLA-4/MHC 11/TCR. La proteína de fusión une CTLA-4 y liga indirectamente el TCR a través de la unión a MHCII en la sinapsis inmune. Los dos lados continuos del triángulo indican el entrecruzamiento de MHCII y CTLA-4 así como MHCII y TCR; el lado discontinuo representa la ligación de CTLA-4 a TCR. La línea punteada indica la inhibición de la señalización de TCR por CTLA-4 unido por BsB. C. Dibujo esquemático que muestra que la acción de BsBA es similar a la de BsB excepto en que es incapaz de ligar el TCR.

Figura 2. Inhibición de la activación alogénica de células T por BsB en una reacción de linfocitos mixtos. Las células T sin activar de ratones C57BL/6 y APC de BALB/c tratadas con LPS e irradiadas se mezclaron con las construcciones de ensayo durante 2 días. Los medios de cultivo se recogieron y ensayaron para IL-2. Sólo los BsB y CTLA-4Ig inhibieron la activación de las células T, como se indica por una cantidad disminuida de IL-2 en los medios. La figura es representativa de más de cinco estudios independientes pero similares.

Figura 3. Inducción de Tregs Foxp3⁺ y producción de IL-10 y TGF- β por BsB. (A) Se pusieron a punto reacciones de linfocitos mixtos alogénicos como se describe en la leyenda de la Figura 2, usando células sin activar CD4⁺CD62L^{hi}CD25⁻GFP⁺ que se habían aislado de

ratones con inserciones génicas Foxp3-EGFP en presencia de las construcciones de ensayo. Cinco días después de la activación, las células T CD4⁺ se analizaron para expresión de GFP por citometría de flujo. Los Tregs se seleccionaron como células GFP⁺ y CD25⁺. Sólo el tratamiento con BsB dio lugar a la expresión de GFP, lo que indica la inducción de Tregs Foxp3⁺ (panel medio de la izquierda). Los medios de cultivo se recogieron para análisis de citoquinas (paneles de la derecha), que reveló niveles elevados de IL-10 y TGF- β en presencia de BsB. Los datos son representativos de numerosos estudios independientes pero similares. (B) El requerimiento de TGF- β autocrino para la inducción de Treg se indica por el bloqueo completo de la inducción de Treg en presencia de un anticuerpo bloqueante para TGF- β , mientras que un Ab control no influyó de manera detectable en la inducción de Treg.

Figura 4. Inducción mediada por BsB de Tregs específicos de antígeno *in vitro*. (A)

Inducción *in vitro* de Tregs específicos de Ova₂₃₃₋₃₃₉. Se mezclaron células T OT-II sin activar con APC singénicas activadas por LPS e irradiadas en presencia de 0,5 μ g/ml de péptido Ova₂₃₃₋₃₃₉. Se añadieron mIgG2a control, BsB, y BsB más un anticuerpo anti-TGF- β (α TGF- β) y se ensayó como se indica (paneles de la izquierda). Las células se cultivaron durante 5 días y se marcaron con anticuerpos anti-CD25 y anti-Foxp3 antes de analizarlas por citometría de flujo. Se ensayaron los niveles de IL-2, IL-10 y TGF- β en el medio de cultivo por ELISA (paneles de la derecha). (B) Monitorización de proliferación de Tregs inducidos. Se realizaron estudios como en A excepto que las células T OT-II sin activar se pre-marcaron con CFSE antes de ser mezcladas con las APC. Las células se separaron en canales fluorescentes Foxp3 y CFSE.

Figura 5. Función supresora de Tregs inducidos por BsB. (A) Se purificaron Tregs inducidos por BsB o TGF- β por citometría de flujo y se mezclaron con células T respondedoras sin activar marcadas con CFSE preparadas a partir de ratones C57BL/6 en las proporciones indicadas en transwells (columnas llenas) o pocillos de cultivo normales (columnas con entramado). Se añadieron APC de BALB/c alogénicas tratadas con LPS para estimular la activación de las células T. Los resultados (media + desviación estándar) indican el porcentaje de células T respondedoras que proliferan (Tresp), tomando como base una dilución CFSE sin Tregs (Tresp + APC sólo) ajustada a 100%. (B) Se añadieron anticuerpos anti-IL-10 y anti-TGF- β a las células en pocillos de cultivo normales a una proporción Tresp:Treg de 1:1 para determinar la contribución de las citoquinas a la proliferación de las células T. El anticuerpo anti-TGF- β inhibió parcialmente la función supresora de Tregs inducidos por TGF- β (panel de la izquierda) pero no afectó los Tregs inducidos por BsB (panel de la derecha). La figura es representativa de más de tres estudios independientes pero similares.

Figura 6. Regulación a la baja de la fosforilación de AKT y mTOR por BsB. Se cultivaron células T sin activar en placas de 96 pocillos de fondo redondo co-recubiertas con anti-CD3, anti-CD28 y BsB, IgG de ratón (mIgG) o PD-L1 de ratón (mPD-L1) durante 18 h. Las células que se consideraron no activadas se cultivaron en pocillos recubiertos sólo con IgG. El estado de fosforilación de AKT y mTOR se monitorizó por citometría de flujo después de tinción con anticuerpos marcados fluorescentemente para AKT y mTOR fosforilados. MFI indica intensidad media de fluorescencia. Esta figura representa uno de tres experimentos independientes.

Figura 7. Expresión sostenida de Foxp3 en Tregs en respuesta a la estimulación continua con BsB. Se co-recubrieron placas de 96 pocillos de fondo redondo con anti-CD3, anti-CD28 y BsB o IgG de ratón. Se cultivaron células T sin activar de ratones con inserción génica de Foxp3-EGFP durante 5 días para inducir Tregs (paneles de la izquierda), que se purificaron a partir de células tratadas con BsB (cuadrado rojo) y se re-estimularon en otra ronda de cultivo en pocillos co-recubiertos, como anteriormente, durante 5 días, antes del análisis por citometría de flujo para células GFP⁺. El re-cultivo de Tregs purificados con la IgG de ratón control durante 5 días resultó en una pérdida de la expresión de Foxp3⁺ en ~60% de las células (cuadrante superior derecho del panel superior de la derecha), mientras que menos del 7% de los Tregs re-cultivados con BsB había perdido la expresión de Foxp3⁺ (cuadrante superior derecho del panel inferior de la derecha). Esta figura representa uno de tres experimentos independientes.

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

Figura 9. Análisis de glicosilación ligada a asparagina en BsB. La secuencia de aminoácidos de BsB se sometió al Servidor NetNGlyc 1.0 para predicción de sitios de glicosilación ligados a Asn. Se predijo un total de 10 sitios de glicosilación ligados a Asn (indicados N), otros aminoácidos se presentan como puntos. También se realizó la composición monosacáridica de BsB para determinar la composición de los glicanos fucosa (Fuc), , N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa (Gal), , manosa (Man), ácido siálico (ácido N-acetilneurámico). Una proporción ácido siálico:galactosa de 0,68 indica que aproximadamente un tercio de los residuos de galactosa están disponibles para unión al receptor asialoglicoproteína.

Figura 10. El tratamiento de ratones no diabéticos (NOD) con BsB retrasó el inicio de la diabetes tipo 1 (T1D) en un paradigma de tratamiento de prevención tardío. (A) Niveles de Tregs Foxp3⁺ en la sangre de ratones NOD tratados con BsB (círculos cerrados, n=15) y ratones NOD control tratados con disolución salina (triángulos cerrados, n=14). Hubo un incremento moderado pero significativo en el número de Tregs en los animales tratados con BsB sobre el observado en los animales control. (B) Incidencias acumulativas de diabetes manifiesta en animales NOD tratados con BsB (círculos llenos) o disolución salina (triángulos llenos).

Figura 11. El tratamiento de ratones NOD con BsB retrasó el inicio de T1D en un paradigma de tratamiento de prevención temprano. (A) Niveles de Tregs Foxp3⁺ en la sangre de ratones tratados con BsB (círculos cerrados, n=10), disolución salina (triángulos cerrados, n=10), CTLA-4Ig (cuadrados cerrados, n=10) e IgG2a de ratón (cuadrados abiertos, n=10). No se detectó ningún incremento en el número de Tregs Foxp3⁺ después de dos semanas de tratamiento con BsB cuando se comparó con controles tratados con disolución salina o mIgG2a. Sin embargo, el tratamiento con CTLA-4Ig resultó en una disminución estadísticamente significativa en el número de Tregs Foxp3⁺ en la sangre. (B) Incidencias acumulativas de diabetes manifiesta en animales tratados con BsB o controles. El tratamiento con BsB resultó en un retraso significativo en el inicio de T1D cuando se comparó con los grupos control tratados con disolución salina o IgG2a de ratón antes de 24 semanas de edad ($p=0,04$). Sin embargo, no se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos al final del estudio. Los datos representan uno de dos estudios separados con resultados similares, con un total de 26 ratones NOD en cada grupo.

Figura 12. El tratamiento a largo plazo de ratones NOD con BsB retrasó significativamente el inicio de T1D en ratones NOD. (A) Incidencias acumulativas de diabetes manifiesta en ratones tratados con BsB (n=16) y no tratados (n=16). El tratamiento con BsB redujo significativamente la incidencia de T1D cuando se comparó con los tratados con disolución salina ($p<0,01$). (B) Análisis histopatológico de tejidos pancreáticos de animales tratados con disolución salina o BsB. Los paneles a-c representan secciones de ratones tratados con disolución salina que permanecieron no diabéticos con H&E, un anticuerpo frente a la insulina, o anti-CD3 y forkhead caja P3 (Foxp3), respectivamente. Se notaron observaciones similares en ratones NOD tratados con BsB que permanecieron sin enfermedad. No se observó ninguna evidencia de infiltración o insulitis en ninguna de las secciones; unos pocos Tregs Foxp3⁺ pueden estar presentes (flechas en el panel c). Los paneles d-f representan secciones pancreáticas de animales NOD diabéticos. Fue claramente evidente una insulitis invasiva y las

células β productoras de insulina fueron destruidas completamente (e). También se detectaron algunas infiltraciones de células T $CD3^+$, junto con unos pocos Tregs y muchos leucocitos distintos de células T con núcleos azules (f). Los paneles g-i muestran islotes de animales tratados con BsB que permanecieron no diabéticos presentando peri-insulitis característica. Se observaron infiltraciones de leucocitos pero estaban restringidas a la periferia de los islotes. Además, no hubo una destrucción importante de las células β productoras de insulina. La mayor parte de los leucocitos en la periferia no eran células T (núcleos azules). Un inserto aumentado (panel j, representa cuadrado rojo en i) indicó que los Tregs $Foxp3^+$ (cabeza de flecha amarilla) estaban entremezclados con otras células T $CD3^+$ y leucocitos distintos de células T (núcleos azules) en la periferia de los islotes. Las imágenes se adquirieron con un objetivo 40x; el inserto se adquirió con un objetivo 60x, que se aumentó adicionalmente 3x digitalmente.

Descripción Detallada de la Invención

A no ser que se afirme otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. En la práctica o ensayo de la presente invención pueden usarse cualesquiera métodos y materiales con función similar o equivalente a los descritos en la presente memoria. Ahora se describen los métodos, dispositivos y materiales adecuados para dichos usos. Todas las publicaciones citadas en la presente memoria se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad para el propósito de describir y divulgar las metodologías, reactivos y herramientas indicadas en las publicaciones que podrían usarse en conexión con la invención.

Los métodos y técnicas de la presente solicitud se realizan generalmente según los métodos convencionales muy conocidos por los expertos en la técnica y como se describe en las diferentes referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente especificación a no ser que se indique otra cosa. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Gennaro, A. R., ed. (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co.; Hardman, J. G., Limbird, L. E., y Gilman, A. G., eds. (2001) The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10ª ed., McGraw-Hill Co.; Colowick, S. et al., eds., Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; Weir, D. M., y Blackwell, C. C., eds. (1986) Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, Blackwell Scientific Publications; Maniatis, T. et al., eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al., eds. (1999) Short Protocols in Molecular Biology, 4ª edición, John Wiley & Sons; Ream et al., eds. (1998)

Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press; Newton, C. R., y Graham, A., eds. (1997) PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2ª ed., Springer-Verlag.

El término "anticuerpo", a no ser que se indique otra cosa, se usa para referirse a anticuerpos completos así como a fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos. *Por ejemplo*, el

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "fragmentos de anticuerpo" se refiere a partes de un anticuerpo intacto de longitud completa - tal como una región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; fragmentos divalentes; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única (por ejemplo, scFv); fragmentos de anticuerpo multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos, trispecíficos y multiespecíficos (por ejemplo, fragmentos divalentes, fragmentos trivalentes, fragmentos tetravalentes); proteínas de fusión con dominio de unión de inmunoglobulina; anticuerpos camelizados; minicuerpos; anticuerpos recombinantes quelantes; tricuerpos o bicuerpos; intracuerpos; nanocuerpos; inmunofarmacéuticos pequeños modulares (SMIP), anticuerpos que contienen V_{HH}; y cualesquiera otros polipéptidos formados a partir de fragmentos de anticuerpo, *por ejemplo* como se describe adicionalmente más adelante.

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

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

Las inmunoglobulinas naturales tienen una estructura central común en la que dos cadenas ligeras idénticas (aproximadamente 24 kD) y dos cadenas pesadas idénticas (aproximadamente 55 ó 70 kD) forman un tetrámero. La parte amino terminal de cada cadena se conoce como la región variable (V) y puede distinguirse de las regiones constantes (C) más conservadas del resto de cada cadena. En la región variable de la cadena ligera (también denominado el dominio V_L) está una parte C terminal conocida como la región J. En la región variable de la cadena pesada (también denominado el dominio V_H), está una región D además de la región J. La mayor parte de la variación en la secuencia de aminoácidos en las inmunoglobulinas está confinada en tres localizaciones separadas en las regiones V conocidas como regiones hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que están

directamente implicadas en la unión al antígeno. Desde el extremo amino, estas regiones se designan CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. Las CDR se mantienen en su sitio por regiones marco (FR) más conservadas. Desde el extremo amino, estas regiones se designan FR1, FR2, FR3 y FR4, respectivamente. Se ha definido las localizaciones de las regiones CDR y FR y un sistema de numeración por Kabat et al. (Kabat, E.A., et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, y las actualizaciones de ésta que pueden encontrarse en línea.

Un anticuerpo monoclonal humanizado, como se refiere en la presente memoria, es un anticuerpo que está compuesto por un marco de anticuerpo humano, en el que se han injertado CDR de un anticuerpo no humano. Los procedimientos para el diseño y producción de anticuerpos humanizados son muy conocidos en la técnica, y se han descrito, *por ejemplo*, en Cabilly et al., Patente U.S. No. 4.816.567; Cabilly et al., Solicitud de Patente Europea 0 125 023; Boss et al., Patente U.S. No. 4.816.397; Boss et al., Solicitud de Patente Europea 0 120 694; Neuberger, M.S. et al., WO 86/01533; Neuberger, M.S. et al., Solicitud de Patente Europea 0 194 276 B1; Winter, Patente U.S. No. 5.225.539; Winter, Solicitud de Patente Europea 0 239 400; Padlan, E.A. et al., Solicitud de Patente Europea 0 519 596. Los detalles adicionales sobre anticuerpos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos preparados por ingeniería, y métodos para su preparación pueden encontrarse en Kontermann, R. y Dübel, S. eds. (2001, 2010) *Anticuerpo Engineering*, 2ª ed., Springer-Verlag, Nueva York, NY, 2001.

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

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

“Ácido nucleicos” como se refiere en la presente memoria incluyen típicamente moléculas de ADN que codifican los anticuerpos de la invención. Se prefieren vectores de expresión, que son adecuados para expresar los genes de anticuerpo en una célula huésped. Los vectores de expresión y células huésped para la expresión de genes de anticuerpo son conocidos en la

técnica; véase, por ejemplo, Morrow, K.J. (2008) *Genetic Engineering & Biotechnology News*. (Junio 15, 2008) 28(12), y Backliwal, G., et al. (2008) *Nucleic Acids Res.* 36(15): e96-e96.

“CD80”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere al antígeno CD80 de mamífero así como a mutantes de éste que tienen una avidéz o especificidad de unión incrementada para CTLA-4. Véase Linsley et al., (1994) *Immunity* 1:793-801, y Wu et al., (1997) *J. Exp. Med.* 185(7):1327-1335, incorporadas en la presente memoria por referencia. CD80 de mamífero puede seleccionarse de CD80 de roedor, tal como ratón, o de ser humano.

“CD86”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere al antígeno CD86 de mamífero así como a mutantes de éste que tienen una avidéz o especificidad de unión incrementada para CTLA-4. Véase Linsley et al., (1994) *Immunity* 1:793-801, incorporado en la presente memoria por referencia. CD86 de mamífero puede seleccionarse de CD86 de roedor, tal como ratón, o de ser humano.

“CTLA-4”, tal y como se usa en la presente memoria, se refiere al antígeno 4 asociado con linfocitos citotóxicos (CTLA-4) de mamíferos. La secuencia de CTLA-4 humano puede encontrarse en GenBank, Número de registro AAH74893.1, GI:49904741. CTLA-4 de mamífero puede seleccionarse de CTLA-4 de roedor, tal como ratón, o de ser humano.

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

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

Un agente biológico biespecífico, que puede referirse como un ligando biespecífico, es un ligando que es capaz de unirse, o se unido por, dos dianas simultáneamente. Los anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica y se describen adicionalmente más adelante. En el contexto de la presente invención, las dos dianas son la molécula CTLA-4 en una célula T y el complejo péptido MHC en una APC. El agente biológico biespecífico según la invención puede entrecruzar las dos dianas; mediante la unión de pMHC al TCR en la sinapsis inmune, entrecruza por lo tanto la molécula CTLA-4 con el TCR. Un “agente biológico”, en general, es un agente o terapéutico biológico, que puede ser útil, *inter alia*, para propósitos terapéuticos, de diagnóstico y/o de investigación.

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

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

Antígeno 4 asociado a Linfocitos Citotóxicos (CTLA-4)

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

Estos mecanismos incluyen competición con CD28 para la unión al ligando (Linsley et al., (1994) *Immunity* 1:793-801), inducción de la producción de la enzima tolerogénica indolamina 2,3 dioxigenasa en APC (Grohmann et al., (2002) *Nat Immunol* 3:1097-1101; Onodera et al., (2009) *J Immunol* 183:5608-5614), y desplazamiento de CD28 de la sinapsis inmunológica (Pentcheva-Hoang et al., (2004) *Immunity* 21:401-413). CTLA-4 es homólogo a la molécula co-estimuladora CD28 y comparte los mismos ligandos, CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC). Sin embargo, la unión diferencial de CD80/CD86 en APC respecto a CD28 y CTLA-4 en células T efectoras da lugar a resultados opuestos, con CD28 desencadenando la activación de las células T y CTLA-4

causando la inhibición de las células T. La activación de CTLA-4 por sus ligandos (CD80/86) en APC también estimula el reclutamiento de las fosfatasa SHP-1 (Guntermann y Alexander, (2002) *J Immunol* 168:4420-4429) y PP2A (Baroja et al., (2002) *J Immunol* 168:5070-5078; Chuang et al., (2000) *Immunity* 13:313-322) en la proximidad del TCR de las células T que experimentan activación. La desfosforilación posterior de moléculas clave de señalización asociadas con el TCR resulta en la terminación de la activación de las células T (Griffin et al., (2000) *J Immunol* 164:4433-4442). Además, las intervenciones que estimulan la unión temprana de CTLA-4 con sus ligandos y el entrecruzamiento con el TCR resultan en la disminución prematura de firmas claves de señalización e inhibición consecuente de la activación de las células T, dando lugar a una capacidad de respuesta disminuida o anergia de células T (Blair et al., (1998) *Immunol* 160:12-15; Griffin et al., (2000) *J Immunol* 164:4433-4442; Krummel y Allison, (1996) *J Exp Med* 182:459-465; Walunas et al., (1996) *J Exp Med* 183:2541-2550).

Para estimular el entrecruzamiento de CTLA-4 con el TCR durante la fase temprana de la activación de las células T, se generó una proteína de fusión biespecífica (designada "BsB") que comprende un CD80 mutante (CD80w88a) y el gen 3 de activación de linfocitos (LAG-3). Se diseñaron BsB para unir simultáneamente CTLA-4 y MHCII en la sinapsis inmune y de esta manera entrecruzarlo indirectamente con el TCR a través del emparejamiento cognado de MHCII con el TCR (Karman et al., (2012) *J Biol Chem* epub 2012 Feb 15). En un MLR alogénico, se mostró que BsB era eficaz inhibiendo la activación de las células T. Sorprendentemente, BsB también indujo la producción de IL-10 y TGF- β y estimuló la diferenciación de las células T que experimentan activación a Tregs. IL-10 puede ejercer amplias propiedades inmunosupresoras mediante su capacidad de controlar la activación de macrófagos y células dendríticas (DC), así como auto-regular las células Th1 (Ohata et al., (2007) *Arthritis Rheum* 56:2947-2956). TGF- β puede actuar como un inhibidor de la diferenciación de las células T (Kehrl et al., (1986) *J Exp Med* 163:1037-1050), activación de macrófagos (Tsunawaki et al., (1988) *Nature* 334:260-262; Wahl et al., (1990) *Ann N Y Acad Sci* 593:188-196) y maduración de células dendríticas (Steinman et al., (2003) *Annu Rev Immunol* 21:685-711). Además de sus funciones anti-inflamatorias, IL-10 y TGF- β también pueden influir supuestamente en la función de Treg. Por ejemplo, se ha mostrado que IL-10 induce células Tr1 productoras de IL-10 (Roncarolo et al., (2006) *Immunol Rev* 212:28-50) y actúa en Tregs Foxp3⁺ para mantener la expresión de Foxp3 y de esta manera propagar su función supresora (Murai et al., (2009) *Nat Immunol* 10:1178-1184). De manera similar, se ha indicado que TGF- β es necesario para la inducción de Tregs (Chen et al., (2003) *J Exp Med* 198:1875-1886; Zheng

et al., (2002) *J Immunol* 169:4183-4189) y para mantener su función supresora mediante la estimulación de la expresión de Foxp3 (Marie et al., (2005) *J Exp Med* 201:1061-1067).

Células T Reguladoras (Tregs)

Los Tregs son una subpoblación funcionalmente distinta de células T capaz de controlar las respuestas inmunes a antígenos propios y no propios. Una deficiencia en Tregs resulta en una respuesta inmune intensificada y la presentación de enfermedades autoinmunes (Sakaguchi et al., (1995) *J Immunol* 155:1151-1164). Una investigación extensa ha establecido un papel de estas células T especializadas en el control de todos los aspectos de las respuestas inmunes, en particular en ocasionar auto-tolerancia. Sin estar ligado a una teoría particular, estos descubrimientos indican que los agentes capaces de reforzar la producción in situ de Tregs o la transferencia adoptiva de Tregs pueden emplearse para tratar enfermedad autoinmunes. De hecho, se ha mostrado que las terapias basadas en células Treg usando Tregs recién aislados o expandidos ex vivo son eficaces para tratar modelos animales de diabetes tipo 1 (T1D) (Tang et al., (2004) *J Exp Med* 199:1455-1465; Tarbell et al., (2007) *J Exp Med* 204:191-201) y enfermedad de injerto frente a huésped (Anderson et al., (2004) ; Taylor et al., (2002) *Blood* 99:3493-3499; Zhao et al., (2008) *Blood* 112:2129-2138). En lugar de aislar y expandir Tregs Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ (designados habitualmente como Tregs naturales o nTregs) de sangre periférica o ganglios linfáticos, los Tregs pueden inducirse a partir de células T CD4⁺CD25⁻ sin activar en el contexto de la activación de TCR y en la presencia simultánea de TGF-β. Estos Tregs se refieren frecuentemente como Tregs adaptativos (aTregs) o Tregs inducidos (iTregs). También son Foxp3⁺ y presentan supuestamente funciones supresoras igualmente potentes a las de nTregs (Chen et al., (2003) *J Exp Med* 198:1875-1886; Yamagiwa et al., (2001) *J Immunol* 166:7282-7289; Zheng et al., (2002) *J Immunol* 169:4183-4189). Se ha mostrado que las transferencias adoptivas de aTregs o iTregs son eficaces para conferir protección frente a enfermedad autoinmune en un modelo animal de artritis inducida por colágeno (Gonzalez-Rey et al., (2006) *Arthritis Rheum* 54:864-876). Sin embargo, cada vez es más evidente que los Tregs específicos de antígeno ofrecen un coeficiente terapéutico significativamente mayor que los Tregs policlonales con un repertorio de TCR generalizado (Masteller et al., (2005) *J Immunol* 175:3053-3059; Tang et al., (2004) *J Exp Med* 199:1455-1465; Tarbell et al., (2007) *J Exp Med* 204:191-201), con menos efectos secundarios potenciales en la supresión inmune generalizada. Por esta razón, consideramos evaluar los méritos relativos de BsB en la producción de Tregs específicos de antígeno en un entorno de activación de células T específicas de antígeno *in vitro*. Además, ensayamos su potencial en el tratamiento de la diabetes autoinmune en el ratón diabético no obeso (NOD).

Diabetes Tipo 1

La diabetes tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmune causada por la destrucción específica de tejido de las células β pancreáticas productoras de insulina con el consecuente desarrollo de hiperglucemia. Los ratones diabéticos no obesos (NOD) (ratones hembra en particular) desarrollan espontáneamente células T autorreactivas frente a auto-antígenos específicos de los islotes (por ejemplo, insulina y ácido glutámico descarboxilasa 65). Conjuntamente con otros linfocitos, estas células T autorreactivas inician el desarrollo de peri-insulitis entre las 3 y 4 semanas de edad seguido de insulitis invasiva a las 9 semanas y diabetes manifiesta espontánea entre las 12 y 35 semanas (Anderson y Bluestone, (2005) *Annu Rev Immunol* 23:447-485). Los ratones NOD comparten muchas similitudes con la enfermedad en sujetos humanos tales como la producción de autoanticuerpos específicos del páncreas y la activación de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ autorreactivas. La susceptibilidad de estos ratones a autoinmunidad, como en los seres humanos, está influida por genes para el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), CTLA-4, y LAG-3. Los ratones NOD portan un único haplotipo (H-2⁹⁷) del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), que confiere según se ha constatado el mayor riesgo para la susceptibilidad a la enfermedad (McDevitt et al., (1996) *Hormone and metabolic research* 28:287-288; Wicker et al., (1995) *Annu Rev Immunol* 13:179-200). También se ha indicado polimorfismo de CTLA-4 en ratones NOD (Ueda et al., (2003) *Nature* 423:506-511) y en los seres humanos (Qu et al., (2009) *Genes and immunity* 10 Supl 1:S27-32) y una deficiencia de LAG-3 en el fondo NOD acelera el inicio de T1D con 100% de penetrancia (Bettini et al., (2011) *J Immunol* 187:3493-3498). Como BsB une todas estas dianas, se ensayaron los méritos terapéuticos de BsB en este modelo murino de T1D.

Anticuerpos

La invención engloba fragmentos de unión a antígeno de los anticuerpos mostrados en las reivindicaciones. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "fragmentos" se refiere a partes de anticuerpo intacto de longitud completa - tal como una región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se han mostrado anteriormente.

El término "fragmentos" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a fragmentos capaces de unirse a las dianas especificadas, la molécula CTLA-4 o el complejo pMHC. Estos fragmentos pueden carecer del fragmento Fc de un anticuerpo intacto, aclararse más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión no específica a tejido que un anticuerpo intacto. Estos fragmentos pueden producirse a partir de anticuerpos intactos usando métodos muy conocidos, *por ejemplo* por escisión proteolítica con enzimas tales como papaína

(para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos $F(ab')_2$), o expresión de dichos fragmentos por tecnología recombinante.

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

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

Los anticuerpos y fragmentos también engloban anticuerpos de cadena pesada (HCAb). Estos anticuerpos pueden formar aparentemente regiones de unión a antígeno usando sólo la región variable de cadena pesada, ya que estos anticuerpos funcionales son dímeros sólo de cadenas pesadas (referidos como "anticuerpos de cadena pesada" o "HCAb"). De acuerdo con esto, los anticuerpos y fragmentos pueden ser anticuerpos de cadena pesada (HCAb) que se unen específicamente a las dianas CTLA-4 o pMHC.

Los anticuerpos y fragmentos también engloban anticuerpos que son SMIP o proteínas de fusión de dominio de unión de inmunoglobulinas específicos para las dianas CTLA-4 o pMHC. Estas construcciones son polipéptidos de cadena única que comprenden dominios de unión a antígeno fusionados con dominios de inmunoglobulina necesarios para llevar a cabo las funciones efectoras del anticuerpo (véase WO 2005/017148).

Los anticuerpos y fragmentos también engloban fragmentos divalentes. Éstos son anticuerpos divalentes en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una única cadena polipeptídica, pero usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Esto fuerza a los dominios a emparejarse con dominios

complementarios de otra cadena y de esta manera crea dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, WO 93/11161). Los fragmentos divalentes pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de éste según la invención no reacciona de manera cruzada con ninguna diana distinta de las dianas pretendidas CTLA-4 o pMHC.

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

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

Se ha descrito que los autoanticuerpos naturales son polirreactivos (Casali y Notkins (1989) *Ann. Rev. Immunol.* 7: 515-531), reaccionando con al menos dos (habitualmente más) antígenos o epítomos diferentes que no están estructuralmente relacionados. También se ha mostrado que las selecciones de repertorios de péptidos al azar usando tecnología de exposición en fago en un anticuerpo monoclonal identificarán un rango de secuencias peptídicas que se ajusta al sitio de unión a antígeno. Algunas de las secuencias están altamente relacionadas, ajustándose a una secuencia consenso, mientras que otras son muy diferentes y se han denominado mimotopos (Lane y Stephen (1993) *Current Opinion in Immunology* 5:268-271). Por lo tanto, está claro que el sitio de unión de un anticuerpo, que

comprende dominio V_H y V_L asociados y complementarios, tiene el potencial de unirse a muchos antígenos diferentes de un gran universo de antígenos conocidos.

WO 03/002609 (Domantis) describe la producción de anticuerpos específicos duales en los que cada pareja V_HV_L posee una especificidad dual, es decir, es capaz de unirse a dos epítopos en el mismo o en diferentes antígenos. La conformación puede ser abierta o cerrada, en una conformación abierta, los dos epítopos pueden estar unidos simultáneamente, pero en la conformación cerrada la unión al primer epítipo evita o disuade la unión al segundo.

Las proteínas distintas de inmunoglobulina con múltiples especificidades de unión se conocen en la naturaleza; *por ejemplo*, un número de factores de transcripción se unen tanto a ADN como a otras moléculas de proteína. Sin embargo, los métodos para seleccionar péptidos de unión en la técnica anterior sólo seleccionan péptidos con especificidad única, no dual o múltiple.

Los diferentes equipos investigadores han ligado previamente polipéptidos con residuos de cisteína a una estructura molecular sintética (Kemp, D. S. y McNamara, P. E., (1985) *J. Org. Chem.* Timmerman, P. et al., (2005) *ChemBioChem.* 6(5):821-4). Meloen y colaboradores han usado tris(bromometil)benceno y moléculas relacionadas para la ciclación rápida y cuantitativa de múltiples bucles peptídicos en andamios sintéticos para mimetizar estructuralmente las superficies proteicas (Timmerman, P. et al., (2005) *ibid*). Los métodos para la generación de compuestos farmacéuticos candidatos en los que dichos compuestos se generan uniendo polipéptidos que contienen cisteína a un andamio molecular como *por ejemplo* tris(bromometil)benceno se describen en WO 2004/077062 y WO 2006/078161. La selección de dichas moléculas usando tecnología de exposición se describe en WO 2009/098450. Las realizaciones específicas duales se describen adicionalmente en WO 2010/089117.

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

Producción de anticuerpos

La producción de anticuerpos puede realizarse por cualquier técnica conocida en la técnica, incluyendo en organismos transgénicos tales como cabras (*véase* Pollock et al. (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147- 157), pollos (*véase* Morrow, KJJ (2000) *Genet. Eng. News* 20:1 - 55), ratones (*véase* Pollock et al. *ibid*) o plantas (*véase* Doran PM (2000) *Curr. Opinion Biotechnol.* 11:199-204; Ma, JK-C (1998) *Nat.Med.* 4:601-606; Baez, J. et al. (2000)

*BioPharm.*13:50-54; Stoger, E. et al. (2000) *Plant Mol. Biol.* 42:583-590). Los anticuerpos también pueden producirse por síntesis química; sin embargo, se prefiere la expresión de genes que codifican los anticuerpos en células huésped.

Un polinucleótido que codifica el anticuerpo se aísla y se inserta en una construcción o vector replicable tal como un plásmido para la propagación adicional o expresión en una célula huésped. Las construcciones o vectores (por ejemplo, vectores de expresión) adecuados para la expresión de una inmunoglobulina humanizada según la invención están disponibles en la técnica. Está disponible una variedad de vectores, incluyendo vectores que se mantienen en una única copia o múltiples copias en una célula huésped, o que se integran en el o los cromosomas de la célula huésped. Las construcciones o vectores pueden introducirse en una célula huésped adecuada, y las células que expresan una inmunoglobulina humanizada pueden producirse y mantenerse en cultivo. Puede usarse un único vector o múltiples vectores para la expresión de una inmunoglobulina humanizada.

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

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

promotores de levaduras inducibles tales como alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, metalotioneína y enzimas responsables del metabolismo del nitrógeno o utilización de maltosa/galactosa; promotores de ARN polimerasa II incluyendo promotores virales tales como promotor de polioma, viruela aviar y adenovirus (por ejemplo, adenovirus 2),
5 virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus (en particular el promotor del gen inmediato temprano), retrovirus, virus de la hepatitis B, actina, virus del sarcoma de rous (RSV) y el temprano o tardío del virus de simio 40 y promotores no virales tales como EF-1 alfa (Mizushima y Nagata (1990) *Nucleic Acids Res.* 18(17):5322). Los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar el promotor apropiado para expresar un anticuerpo humanizado o una
10 parte de éste de la invención.

Cuando sea apropiado, por ejemplo, para la expresión en células de eucariotas superiores, pueden incluirse elementos potenciadores adicionales en lugar de o así como los encontrados localizados en los promotores descritos anteriormente. Las secuencias potenciadoras de mamíferos adecuadas incluyen elementos potenciadores de globina, elastasa, albúmina,
15 fetoproteína, metalotionina e insulina. Alternativamente, se puede usar un elemento potenciador de un virus de célula eucariota tal como potenciador de SV40, potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, potenciador de polioma, potenciador baculoviral o locus IgG2a murino (véase WO 04/009823). Aunque dichos potenciadores están localizados típicamente en el vector en un sitio en 5' del promotor, también pueden estar localizados en otro lugar, por
20 ejemplo, en la región no traducida o en 3' de la señal de poliadenilación. La elección y posicionamiento del potenciador puede estar basado en la compatibilidad con la célula huésped usada para la expresión.

Además, los vectores (por ejemplo, vectores de expresión) comprenden típicamente un marcador seleccionable para la selección de células huésped que portan el vector y, en el caso
25 de un vector replicable, un origen de replicación. Los genes que codifican productos que confieren resistencia a antibióticos o fármaco son marcadores seleccionables comunes y pueden usarse en células procariotas (por ejemplo, gen de β -lactamasa (resistencia a ampicilina), gen Tet (resistencia a tetraciclina) y eucariotas (por ejemplo, genes de resistencia a neomicina (G418 o geneticina), gpt (ácido micofenólico), ampicilina o higromicina). Los genes
30 marcadores de dihidrofolato reductasa permiten la selección con metotrexato en una variedad de huéspedes. Los genes que codifican el producto génico de marcadores auxotróficos del huésped (por ejemplo, *LEU2*, *URA3*, *HIS3*) se usan frecuentemente como marcadores seleccionables en levaduras. También se contempla el uso de vectores virales (por ejemplo,

baculovirus) o de fago, y vectores que son capaces de integrarse en el genoma de la célula huésped, tales como vectores retrovirales.

En sistemas eucariotas, las señales de poliadenilación y terminación están unidas de manera operativa a un polinucleótido que codifica el anticuerpo de esta invención. Dichas señales están

- 5 situadas típicamente en 3' del marco de lectura abierto. En los sistemas de mamíferos, los ejemplos no limitativos de señales de poliadenilación/terminación incluyen aquellas derivadas de hormonas de crecimiento, factor de elongación 1 alfa y genes virales (por ejemplo, SV40) o repeticiones retrovirales terminales largas. En sistemas de levaduras, los ejemplos no limitativos de señales de poliadenilación/terminación incluyen aquellas derivadas de los genes de
- 10 fosfoglicerato quinasa (PGK) y alcohol deshidrogenasa 1 (ADH). En sistemas procariotas, las señales de poliadenilación no se requieren típicamente y en su lugar se emplean habitualmente secuencias terminadoras más cortas y definidas. La elección de las secuencias de poliadenilación/terminación puede estar basada en la compatibilidad con la célula huésped usada para la expresión. Además de lo anterior, otras características que pueden emplearse
- 15 para potenciar los rendimientos incluyen elementos remodeladores de cromatina, intrones y modificación de codones específica de la célula huésped. El uso de codones del anticuerpo de esta invención puede modificarse para acomodar el sesgo de codones de la célula huésped de manera que se aumente el rendimiento del transcrito y/o producto (por ejemplo, Hoekema, A. et al. (1987) Mol Cell Biol. 7(8):2914-24). La elección de codones puede estar basada en la
- 20 compatibilidad con la célula huésped usada para la expresión.

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

- 25 Los anticuerpos según esta invención pueden producirse, *por ejemplo*, por la expresión de uno o más ácidos nucleicos recombinantes que codifican el anticuerpo en una célula huésped adecuada. La célula huésped puede producirse usando cualquier método adecuado. *Por ejemplo*, las construcciones de expresión (por ejemplo, uno o más vectores, por ejemplo, un vector de expresión de células de mamífero) descritas en la presente memoria pueden
- 30 introducirse en una célula huésped adecuada, y la célula resultante puede mantenerse (por ejemplo, en cultivo, en un animal, en una planta) en condiciones adecuadas para la expresión de la o las construcciones o vector(es). Las células huésped adecuadas pueden ser procariotas, incluyendo células de bacterianas tales como *E. coli* (*por ejemplo*, cepa DH5aTM (Invitrogen, Carlsbad, CA), células PerC6 (Crucell, Leiden, NL), *B. subtilis* y/o otras bacterias adecuadas;

células eucariotas, tales como células fúngicas o de levadura (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Aspergillus sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Neurospora crassa*), u otras células de eucariotas inferiores y células de eucariotas superiores tales como las de insectos (por ejemplo, células de *Drosophila* Schnieder S2, células de insecto Sf9 (WO 94/126087 (O'Connor), células de insecto TN5BI-4 (HIGH FIVE™) (Invitrogen), de mamíferos (por ejemplo, células COS, tales como COS-1 (ATCC No. de Registro CRL-1650) y COS-7 (ATCC No. de Registro CRL-1651), CHO (por ejemplo, ATCC No. de Registro CRL-9096), CHO DG44 (Urlaub, G. y Chasin, LA., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(7):4216-4220), 293 (ATCC No. de Registro CRL- 1573), HeLa (ATCC No. de Registro CCL-2), CV1 (ATCC No. de Registro CCL-70), WOP (Dailey, L., *et al.*, (1985) *J. Virol.*, 54:739-749), 3T3, 293T (Pear, W. S., *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90:8392-8396), células NSO, células SP2/0, células HuT 78 y semejantes, o de plantas (por ejemplo, tabaco, lemna (lenteja de agua), y algas). Véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. *et al.*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons Inc. (1993). En algunas realizaciones, la célula huésped no es parte de un organismo multicelular (por ejemplo, planta o animal), por ejemplo, es una célula huésped aislada o es parte de un cultivo celular.

Las células huésped pueden cultivarse en matraces de centrifugación, matraces agitados, botellas giratorias, biorreactores wave (por ejemplo Sistema 1000 de wavebiotech.com) o sistemas de fibra hueca pero para la producción a gran escala se prefiere usar biorreactores agitados o biorreactores de bolsa (por ejemplo, Wave Biotech, Somerset, New Jersey EEUU) particularmente para los cultivos en suspensión. Típicamente, los biorreactores con tanque agitado se adaptan para aireación usando, por ejemplo, burbujeadores, deflectores o propulsores de baja cizalla. Para biorreactores de columnas con burbujas y aireadas, puede usarse la aireación directa con burbujas de aire o de oxígeno. Cuando las células huésped se cultivan en un medio de cultivo sin suero, el medio puede suplementarse con un agente protector de las células tal como plurónico F-68 para ayudar a prevenir el daño celular como resultado del proceso de aireación. Dependiendo de las características de la célula huésped, pueden usarse microvehículos como sustratos de crecimiento para líneas celulares dependientes de anclaje, o las células pueden adaptarse a cultivo en suspensión. El cultivo de las células huésped, particularmente células huésped de vertebrados, puede utilizar una variedad de modos de operación tales como procesamiento discontinuo, de alimentación discontinua, discontinuo repetido (véase Drapeau *et al* (1994) *Cytotechnology* 15: 103-109), proceso discontinuo ampliado o cultivo en perfusión. Aunque las células huésped de mamífero transformadas recombinantemente pueden cultivarse en medios que contienen suero tales

como medios que comprenden suero de ternera fetal (FCS), se prefiere que dichas células huésped se cultiven en medios sin suero tal como se describe en Keen et al (1995) *Cytotechnology* 17:153-163, o medios disponibles comercialmente tales como ProCHO-CDM o UltraCHO™ (Cambrex NJ, EEUU), suplementados cuando sea necesario con una fuente de energía tal como glucosa y factores de crecimiento sintéticos tales como insulina recombinante. El cultivo sin suero de células huésped puede requerir que las células se adapten a crecer en condiciones sin suero. Una estrategia de adaptación es cultivar dichas células huésped en medios que contienen suero y cambiar repetidamente el 80% del medio de cultivo por el medio sin suero de manera que las células huésped aprendan a adaptarse a condiciones sin suero (véase por ejemplo, Scharfenberg K .et al (1995) en *Animal Cell Technology Developments Towards the 21st Century* (Beuvery E.C. et al eds), p619-623, Kluwer Academic editores).

Los anticuerpos según la invención pueden secretarse en el medio y recuperarse y purificarse de éste usando una variedad de técnicas para proporcionar un grado de purificación adecuado para el uso pretendido. Por ejemplo, el uso de anticuerpos terapéuticos de la invención para el tratamiento de pacientes humanos obliga típicamente al menos al 95% de pureza según se determina por SDS-PAGE reductora, más típicamente 98% ó 99% de pureza, cuando se compara con el medio de cultivo que comprende los anticuerpos terapéuticos. En el primer caso, los restos celulares del medio de cultivo se eliminan típicamente usando centrifugación seguida de una etapa de aclaramiento del sobrenadante usando, por ejemplo, microfiltración, ultrafiltración y/o filtración en profundidad. Alternativamente, el anticuerpo puede recogerse por microfiltración, ultrafiltración o filtración en profundidad sin centrifugación anterior. Está disponible una variedad de otras técnicas tales como diálisis y electroforesis en gel y técnicas cromatográficas tales como hidroxipatito (HA), cromatografía de afinidad (que implica opcionalmente un sistema de etiquetado de afinidad tal como polihistidina) y/o cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) (véase US 5.429.746). En una realización, los anticuerpos de la invención, después de varias etapas de aclaramiento, se capturan usando cromatografía de afinidad en Proteína A o G seguido de etapas adicionales de cromatografía tales como intercambio iónico y/o cromatografía HA, intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de exclusión por tamaño y precipitación con sulfato de amonio. Típicamente, también se emplean varias etapas de eliminación de virus (por ejemplo, nanofiltración usando, por ejemplo, un filtro DV-20). Después de estas distintas etapas, se proporciona una preparación purificada que comprende al menos 10mg/ml o más, por ejemplo, 100mg/ml o más del anticuerpo de la invención y por lo tanto forma una realización de la invención. La concentración hasta

100mg/ml o más puede generarse por ultracentrifugación. Dichas preparaciones carecen sustancialmente de formas agregadas de los anticuerpos de la invención.

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

La presente invención también se refiere a células que comprenden un ácido nucleico, por ejemplo, un vector, de la invención (por ejemplo, un vector de expresión). *Por ejemplo*, un ácido nucleico (es decir, uno o más ácidos nucleicos) que codifica las cadenas pesada y ligera de una inmunoglobulina humanizada según la invención, o una construcción (es decir, una o más construcciones, por ejemplo, uno o más vectores) que comprende dicho(s) ácido(s) nucleico(s), puede introducirse en una célula huésped adecuada por un método apropiado para la célula huésped seleccionada (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación infección), estando, o convirtiéndose, el o los ácidos nucleicos unidos de manera operativa a uno o más elementos de control de la expresión (por ejemplo, en un vector, en una construcción creada por procesos en la célula, integrada en el genoma de la célula huésped). Las células huésped pueden mantenerse en condiciones adecuadas para la expresión (por ejemplo, en presencia de inductor, medio adecuado suplementado con sales, factores de crecimiento, antibióticos, suplementos nutricionales adecuados, etc.), mediante lo cual se producen el o los polipéptidos codificados. Si se desea, el anticuerpo humanizado codificado puede aislarse, *por ejemplo*, de las células huésped, medio de cultivo o leche. Este proceso engloba la expresión en una célula huésped (por ejemplo, una célula de glándula de mamífero) de un animal o planta transgénico (por ejemplo, tabaco) (véase *por ejemplo*, WO 92/03918).

Ligandos CD80

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

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

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

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

Ligandos LAG-3

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

La eficacia de las mutaciones puede analizarse como se ha descrito anteriormente respecto a los ligandos CD80.

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

Construcciones de Ligando Biespecífico

La construcción de un ligando biespecífico sigue la fórmula general "ligando-conector-ligando". Los anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica y se han descrito anteriormente.

La construcción de ligandos biespecíficos implica preferiblemente la construcción y expresión de un gen apropiado que codifica el polipéptido deseado. Otros métodos para la construcción es mezclar los dos polipéptidos en condiciones que permitan la unión covalente, iónica o hidrofóbica. En realizaciones preferidas, comprende la unión covalente de los polipéptidos. Cuando se construye una molécula biespecífica que comprende tres componentes, tal como un ligando CTLA-4, un conector y un ligando MHC, dos de los tres pueden combinarse, unirse entre sí y el tercer polipéptido añadirse posteriormente al producto de fusión y unirse para crear un producto de fusión que comprende los tres polipéptidos.

Los polipéptidos según la presente invención pueden producirse por cualquier técnica deseada, incluyendo síntesis química, aislamiento de muestras biológicas y expresión de un ácido

nucleico que codifica dicho polipéptido. Los ácidos nucleicos, a su vez, pueden sintetizarse o aislarse de fuentes biológicas y modificarse por mutagénesis dirigida a sitio si se desea.

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

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

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

El inserto de ácido nucleico se une de manera operativa a un promotor apropiado, tal como el promotor del fago lambda PL, los promotores de *E. coli* lac, trp, phoA y tac, los promotores temprano y tardío de SV40 y promotores de LTR retrovirales. Otros promotores adecuados son

conocidos para los expertos en la técnica. Las construcciones de expresión contienen además sitios para el inicio, terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para la traducción. La parte codificadora de los transcritos expresados por las construcciones incluye preferiblemente un codón de inicio de la traducción al comienzo y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) situado apropiadamente al final del polipéptido que se va a traducir.

Como se indica, los vectores de expresión incluyen preferiblemente al menos un marcador seleccionable. Dicho marcador incluye resistencia a dihidrofolato reductasa, G418 o neomicina para cultivo de célula eucariota y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de huésped apropiados incluyen, pero no están limitados a, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*); células de insecto tales como células de *Drosophila* S2 y de *Spodoptera Sf9*; células animales tales como células CHO, COS, HEK293, y células de melanoma de Bowes; y células de planta.

Los medios y condiciones apropiados de cultivo para las células huésped descritas anteriormente son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente.

Entre los vectores preferidos para uso en bacterias se incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles en QIAGEN, Inc.; vectores pBluescript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles en Stratagene Cloning Systems, Inc.; y ptrc99a, pKK2233,

pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles en Pharmacia Biotech, Inc. Entre los vectores eucariotas preferidos están pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI y pSG disponibles en Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles en Pharmacia. Entre los vectores preferidos para uso en la expresión en células de mamífero se incluyen Vector pSG5, pCMV^{*}SPORT6, pcDNA, pCEP4, 5 pREP4, pCI, pSI y pBICEP-CMV. Los vectores de expresión preferidos para uso en sistemas de levaduras incluyen, pero no están limitados a pYES2, pYDI, pTEFI/Zeo, pYES2/GS, pPICZ, pGAPZ, pGAPZalph, pPIC9, pPIC3.5, pHILD2, pHIL-SI, pPIC3.5K, pPIC9K, y PA0815 (todos disponibles en Invitrogen, Carlsbad, CA).

La introducción de la construcción en la célula huésped puede efectuarse por transfección con 10 fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, u otros métodos. Dichos métodos se describen en muchos manuales estándar de laboratorio, tales como Sambrook et al., referido anteriormente. Un polipéptido según la invención puede recuperarse y purificarse de cultivos de células recombinantes por métodos muy conocidos incluyendo precipitación con sulfato de 15 amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxiapatito y cromatografía en lectina. Los más preferiblemente, se emplea cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación.

Los polipéptidos según la presente invención también pueden recuperarse de fuentes 20 biológicas, incluyendo fluidos corporales, tejidos y células, especialmente células derivadas de tejido tumoral o tejidos que se sospecha que son tumorales de un sujeto.

Además, los polipéptidos según la invención pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la técnica (*por ejemplo, véase* Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman & Co. , N. Y. , y Hunkapiller et al., (1984) *Nature*, 310:105-111). *Por 25 ejemplo*, puede sintetizarse un polipéptido que comprende todo o parte de un ligando biespecífico según la invención por el uso de un sintetizador de péptidos.

Los ligandos biespecíficos según la invención se describen con detalle en las SEQ IDs adjuntas a la presente. Las SEQ ID NOs: 1 y 2 proporcionan las secuencias sucedáneas de ADN y proteína de ratón de ligandos biespecíficos en los que el ligando CTLA-4 CD80w88a está 30 emparejado con el ligando MHC LAG-3, separados por la región Fc de IgG2a y una secuencia Gly-9 (G9). Se proporciona una etiqueta His terminal (H6) en el extremo C. Las SEQ ID NOs: 3 y 4 proporcionan las secuencias sucedáneas de ADN y proteína de ratón para las mismas construcciones que las SEQ ID NOs: 1 y 2, excepto en que la región Fc de IgG2a está situada C terminal respecto al polipéptido LAG-3, de manera que los péptidos CD80 y LAG-3 están

separados sólo por G9. Las dos disposiciones, con la región Fc entre los ligandos o C terminal a éstos, se refieren como construcciones de gen 1 y gen 2, respectivamente.

Las SEQ ID NOs: 5 y 6 proporcionan las secuencias de ADN y proteína humanas en las que se ha mantenido la secuencia de tipo salvaje. No se han hecho mutaciones, ni en CD80 o LAG-3.

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

Aplicaciones Terapéuticas

- 10 La supresión de la actividad de las células T es deseable en varias situaciones en las que se garantiza la inmunosupresión y/o se produce una afección autoinmune. De acuerdo con esto, tomar como diana la interacción CTLA-4/MHC está indicado en el tratamiento de enfermedades que implican una respuesta inmune inapropiada y/o no deseada, tal como inflamación, autoinmunidad y afecciones que implican dichos mecanismos. En una realización, dicha enfermedad o trastorno es una enfermedad autoinmune y/o inflamatoria. Los ejemplos de
- 15 dichas enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias se han mostrado anteriormente.

En una realización, dicha enfermedad o trastorno es Diabetes Tipo 1 (T1D).

- En otra realización, los ligandos según la invención se usan para ayudar en el trasplante mediante la inmunosupresión del sujeto. Dicho uso alivia la enfermedad de injerto frente a huésped. Para una descripción de los tratamientos existentes para la enfermedad de injerto
- 20 frente a huésped, véase Svennilson, (2005) *Bone Marrow Transplantation* 35:S65–S67, y las referencias citadas en ella. Ventajosamente, los anticuerpos de la invención pueden usarse en combinación con otras terapias disponibles.

- Respecto al tratamiento de enfermedades autoinmunes, la terapia de combinación puede incluir la administración de un ligando de la presente invención junto con un medicamento, que
- 25 conjuntamente con el ligando comprende una cantidad eficaz para prevenir o tratar dichas enfermedades autoinmunes. Cuando dicha enfermedad autoinmune es Diabetes Tipo 1, la terapia de combinación puede englobar uno o más de un agente que estimula el crecimiento de células beta pancreáticas o potencia el trasplante de células beta, tal como el crecimiento de células beta o factores de supervivencia o anticuerpos inmunomoduladores. Cuando dicha
- 30 enfermedad autoinmune es artritis reumatoide, dicha terapia de combinación puede englobar uno o más de metotrexato, un anticuerpo anti-TNF- α , una proteína de fusión receptor de TNF- α -Ig, un anticuerpo anti-IL-6, o anti-IL17, o anti-IL-15 o anti-IL-21, un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo (NSAID), o un fármaco anti-reumático modificador de la enfermedad (DMARD). Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente biológico tal como un agente anti-TNF (por

ejemplo, Enbrel®, infliximab (Remicade® y adalimumab (Humira®) o rituximab (Rituxan®). Cuando dicha enfermedad autoinmune es rechazo de trasplante hematopoyético, pueden administrarse factor(es) de crecimiento hematopoyético (*tales como* eritropoyetina, G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-11, trombopoyetina, *etc.*) o antimicrobiano(s) (*tales como* fármacos antibióticos, antivirales, antifúngicos). Cuando dicha enfermedad autoinmune es psoriasis, el agente adicional puede ser uno o más de alquitrán y derivados de éste, fototerapia, corticosteroides, Ciclosporina A, análogos de la vitamina D, metotrexato, inhibidores de la proteína quinasa activada por el mitógeno p38 (MAPK), así como agentes biológicos tales como agentes anti-TNF- α y Rituxan®. Cuando dicha enfermedad autoinmune es una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) tal como, *por ejemplo*, la Enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, el agente adicional puede ser uno o más de aminosalicilatos, corticosteroides, inmunomoduladores, antibióticos o agentes biológicos tales como Remicade® y Humira®.

El tratamiento de combinación puede llevarse a cabo de cualquier forma que el experto en la técnica considere necesaria o conveniente y para el propósito de esta especificación, no se contemplan limitaciones respecto al orden, cantidad, repetición o cantidad relativa de los compuestos que se van a usar en combinación. De acuerdo con esto, los anticuerpos según la presente invención para uso en terapia pueden formularse en composiciones farmacéuticas. La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden péptidos según la presente invención.

Composiciones Farmacéuticas

En una realización preferida, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un ligando biespecífico según la invención, o un ligando o ligandos identificables por un método de ensayo como se ha definido en el aspecto previo de la invención. Los ligandos pueden ser inmunoglobulinas, péptidos, ácidos nucleicos o moléculas pequeñas, como se discute en la presente memoria. Se refieren, en la siguiente discusión, como “compuestos”.

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

En otra realización, pueden usarse uno o más compuestos de la invención en combinación con cualquier compuesto reconocido en la técnica que se sabe que es adecuado para tratar la indicación particular en el tratamiento de cualquiera de las afecciones mencionadas anteriormente. De acuerdo con esto, uno o más compuestos de la invención pueden

5 combinarse con uno o más compuestos reconocidos en la técnica que se sabe que son adecuados para tratar las indicaciones anteriores de manera que puede administrarse una composición única conveniente al sujeto. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

Por ejemplo, pueden administrarse varias dosis divididas diariamente o la dosis puede reducirse

10 proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

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

Dependiendo de la ruta de administración, el ingrediente activo puede requerir un recubrimiento

15 en un material para proteger dichos ingredientes de la acción de enzimas, ácido y otras condiciones naturales que pueden inactivar dicho ingrediente.

Con el fin de administrar el ingrediente activo por administración diferente de la parenteral, se recubrirá con, o se administrará con, un material para evitar su inactivación. *Por ejemplo*, el ingrediente activo puede administrarse en un adyuvante, co administrarse con inhibidores

20 enzimáticos o en liposomas. Adyuvante se usa en su sentido más amplio e incluye cualquier compuesto inmunoestimulador tal como interferón. Los adyuvantes contemplados en la presente memoria incluyen resorcinolos, tensioactivos no iónicos tales como polioxietilen oleil éter y n-hexadecil polietilen éter. Los inhibidores enzimáticos incluyen tripsina pancreática.

Los liposomas incluyen emulsiones CGF agua en aceite en agua así como liposomas convencionales.

25

El ingrediente activo también puede administrarse parenteralmente o intraperitonealmente.

También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilen glicoles líquidos y mezclas de éstos y en aceites. En las condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación

30 extemporánea de disoluciones inyectables estériles o dispersión. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista una jeringabilidad fácil. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la

acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, *por ejemplo*, agua, etanol, poliol (*por ejemplo*, glicerol, propilen glicol, y polietilen glicol líquido, y *semejantes*), mezclas adecuadas de éstos y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, *por ejemplo*, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos.

La prevención de la acción de microorganismos puede conseguirse por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, *por ejemplo*, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y semejantes. En determinados casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, *por ejemplo*, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, *por ejemplo*, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando el ingrediente activo en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el ingrediente activo esterilizado en un vehículo estéril que contiene el medio básico de dispersión y los demás ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado en vacío y la técnica de liofilización que rinde un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de la disolución de éste previamente esterilizada por filtración.

Tal y como se usa en la presente memoria "vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción y semejantes. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Excepto desde el momento en el que cualquier medio convencional o agente sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla el uso de éstos en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse en las composiciones ingredientes activos suplementarios.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación tal y como se usa en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para

producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las nuevas formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del material activo y el efecto terapéutico particular que se quiere conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos tales como material activo para el tratamiento de enfermedad en

5 sujetos vivos que tienen una afección patológica en la que la salud corporal está alterada. Los ingredientes activos principales se utilizan para preparar compuestos para administración conveniente y eficaz en cantidades eficaces con un vehículo adecuado farmacéuticamente aceptable en forma unitaria de dosificación. En el caso de composiciones que contienen

10 ingredientes activos suplementarios, las dosificaciones se determinan por referencia a la dosis y manera de administración habituales de dichos ingredientes.

Con el fin de facilitar la administración de los compuestos peptídicos, incluyendo anticuerpos, a células, los péptidos pueden modificarse con el fin de mejorar su capacidad de cruzar una membrana celular. *Por ejemplo*, US 5.149.782 describe el uso de péptidos fusogénicos,

15 péptidos formadores de canales iónicos, péptidos de membrana, ácidos grasos de cadena larga y otros agentes de mezclado de membrana para incrementar el transporte de proteínas a través de la membrana celular. Éstos y otros métodos también se describen en WO 97/37016 y US 5.108.921, incorporados en la presente memoria por referencia.

En un aspecto adicional se proporciona el ingrediente activo de la invención como se ha definido anteriormente en la presente memoria para uso en el tratamiento de enfermedad bien solo o en combinación con compuestos reconocidos en la técnica que se sabe que son adecuados para tratar la indicación particular. Consecuentemente, se proporciona el uso de un ingrediente activo de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad asociada con una respuesta inmune aberrante.

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

La invención se describe adicionalmente, sólo para propósitos de ilustración, en los ejemplos siguientes.

30 **Ejemplos**

Ejemplo 1

Diseño de una proteína de fusión biespecífica que une CTLA-4 y lo entrecruza con el TCR a través de MHC 11.

Para generar una proteína de fusión biespecífica que una selectivamente y agonísticamente CTLA-4 y lo ligue simultáneamente al TCR, se fusionó CD80 mutante (CD80w88a, referido de aquí en adelante como CD80wa) que se une a CTLA-4 pero tiene una afinidad mínima para CD28 (Wu et al., 1997) con LAG-3, un ligando natural de MHCII (Baixeras et al., 1992; Triebel et al., 1990). CD80wa se unió a LAG-3 usando un conector compuesto por nueve glicinas, que a su vez estaba unido a la parte Fc de IgG2a de ratón para incrementar supuestamente su vida media circulante (Fig. 1A). En respuesta a un ligando de esta configuración, se espera que se produjera la unión de CTLA-4 y la ligación al TCR indirectamente, mediante la formación del complejo tri-molecular (CTLA-4/MHCII/TCR) en las sinapsis inmunes durante la activación temprana de las células T (Fig. 1B). Conceptualmente, fuera del contexto de la sinapsis inmune, la unión de la proteína de fusión biespecífica a CTLA-4 o MHCII solos o a ambos CTLA-4 y MHCII no debería dar lugar a la inhibición de la actividad de las células T. La unión de CTLA-4 por CD80wa se diseñó para desencadenar la señalización de CTLA-4 a través del reclutamiento de fosfatasa en la cola citoplásmica de CTLA-4. Mientras tanto, se pretendió que la unión de LAG-3 a MHCII pusiera a CTLA-4 en la proximidad del TCR cognado, que se une al complejo pMHCII en la sinapsis inmune (Fig. 1B). Se esperaba que la combinación de estos dos eventos de unión proporcionara una señal inhibidora al TCR. También se construyó una proteína de fusión control que comprende CD80wa y Fc de IgG2a (Fig. 1A), que no debería ser capaz de entrecruzar CTLA-4 con el TCR (Fig. 1C) ya que carece de LAG-3.

Las proteínas de fusión de ensayo y control se expresaron en células de ovario de hámster chino y se purificaron con cromatografía de afinidad en una columna de proteína G. Los agregados se eliminaron usando cromatografía de exclusión por tamaño. La proteína de fusión biespecífica de ensayo (CD80wa-LAG-3-Fc) se refiere como BsB (secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO. 3; secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 4), y la construcción control (CD80wa-Fc) se conoce como BsBΔ (secuencia de nucleótidos: SEQ ID NO. 16; secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 17). Como se esperaba, ambas proteínas de fusión aparecieron como dímeros en geles de SDS-PAGE no reductora (BsB, 200 kDa; BsBΔ 140 kDa) y como monómeros (BsB, 100 kDa; BsBΔ 70 kDa) en geles de SDS-PAGE reductora. Sus identidades se confirmaron además por transferencia Western, usando anticuerpos frente a LAG-3 y CD80.

Ejemplo 2

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

La capacidad relativa de BsB y BsBΔ para inhibir la activación de las células T se evaluó en una reacción alogénica de linfocitos mixtos midiendo la producción de IL-2. Células T CD4⁺CD25⁻CD62L^{high}CD44^{low} sin activar que se habían purificado de ratones BALB/c se mezclaron con

APC aisladas de ratones C57BL/6 en presencia o ausencia del BsB o BsBΔ. Se incluyeron IgG2a murina y CTLA-4Ig, un inhibidor de la co-estimulación que se une a CD80/86 y bloquea sus unión a CD28, como controles negativo y positivo, respectivamente. La inclusión de BsB pero no de BsBΔ en la reacción de linfocitos mixtos inhibió la producción de IL-2 pero no en el mismo grado al conseguido por CTLA-4Ig (Fig. 2). Esta diferencia fue probablemente el resultado de que la inhibición de las células T mediada por BsB ocurría después que la inhibición mediada por CTLA-4Ig. Más específicamente, para BsB, la inhibición sólo ocurrió después de que CTLA-4 se regulara al alza después de la activación de las células T. La incapacidad de BsBΔ de reducir la producción de IL-2 sugiere fuertemente que sólo la activación de CTLA-4 es insuficiente para evitar la activación de las células T porque se requiere el entrecruzamiento simultáneo al TCR. Para excluir la posibilidad de que la parte LAG-3 de BsB juegue un papel en la inhibición de las células T, LAG-3Ig se ensayó en este ensayo y se verificó que no inhibía la activación de las células T.

Ejemplo 3

BsB dirige la diferenciación de las células T a Tregs.

Se ha mostrado que la terminación temprana de la señalización de TCR por la eliminación de la estimulación con antígeno, inhibición de la señalización de mTOR, estimulación subóptima de TCR debida a un antígeno de baja afinidad, o co-estimulación débil durante la activación de las células T induce la expresión de Foxp3⁺ e inclina la diferenciación de las células T hacia un fenotipo Treg (Delgoffe et al., (2009) *Immunity* 30:832-844; Haxhinasto et al., (2008) *J. Exp. Med.* 205:565-574; Sauer et al., (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:7797-7802). Como BsB fuerza la activación temprana del TCR por CTLA-4 inducido por activación con la atenuación consecuente de la señalización de TCR, también se evaluó su capacidad para generar Tregs Foxp3⁺. Se mezclaron células T CD4⁺CD62L^{high}GFP⁺ sin activar preparadas a partir de ratones con inserción génica de Foxp3-EGFP (Haribhai et al., (2007) *J. Immunol* 178:2961-2972) con APC alogénicas tratadas con LPS en presencia de BsB o BsBΔ. El análisis por citometría de flujo de las células después de cinco días de cultivo reveló un gran número de células T CD4⁺CD25⁺GFP⁺ entre las células tratadas con BsB (Fig. 3A, panel medio de la izquierda) pero no entre las células tratadas con IgG2a de ratón (Fig. 3A, panel superior de la izquierda) o el BsBΔ control (Fig. 3A, panel inferior de la izquierda), lo que sugiere que estas células T CD4⁺CD25⁺GFP⁺ eran Tregs Foxp3⁺. Para confirmar este descubrimiento, se recogieron los medios de cultivo y se ensayaron para la firma de citoquinas Treg, IL-10 y TGF-β (Cools et al., (2008) *J. Cell Mo/. Med.* 12:690-700). Se detectaron grandes cantidades de IL-10 y TGF-β en los medios de células tratadas con BsB (Fig. 3A, paneles de la izquierda) pero no en los medios

de células tratadas con BsBΔ o mIgG2a. Sorprendentemente, CTLA-4Ig no indujo la generación de Tregs GFP⁺ o la producción de IL-10 y TGF-β. Sin estar vinculado a una teoría particular, el mecanismo por el que CTLA-4Ig restringe la respuesta de las células T es diferente del de BsB. LAG-3Ig solo o en combinación con BsBΔ también fracasó en inducir la generación de Tregs GFP⁺, lo que sugiere que se requería el entrecruzamiento mediado por BsB de CTLA-4 con el TCR para la inducción de Treg.

Ejemplo 4

La Inducción de Tregs por BsB requiere TGF-β auto-estimulado

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

Se ha mostrado que los Tregs tienen un potencial terapéutico considerable en la modulación de las manifestaciones de enfermedad en varios modelos animales de enfermedades autoinmunes. Sin embargo, se ha subrayado la importancia de la especificidad de los Tregs inducidos frente a los antígenos relevantes. Los Tregs no específicos de antígeno que no se activarán frente a autoantígenos particulares en el contexto de células T reactivas específicas de autoantígeno son presumiblemente inmunosupresores no funcionales. Por lo tanto, las estrategias que facilitan la generación de grandes números de Tregs específicos de antígeno son altamente deseables para tratar estas dolencias. Además, se prefieren las estrategias que facilitan la inducción de novo de Tregs específicos de antígeno in situ (por ejemplo, en islotes de páncreas para T1D o en lámina propia para colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn) sobre el uso de transferencia adoptiva de Tregs diferenciados o expandidos *in vitro*.

Ejemplo 5

Los Tregs inducidos por BsB son funcionalmente supresores de una manera dependiente del contacto célula-célula.

Para evaluar si los Tregs inducidos por BsB eran funcionalmente supresores, se purificaron Tregs inducidos por BsB y Tregs inducidos por TGF- β , que sirvieron como un control, usando separación celular activada por fluorescencia (FACS) y se mezclaron con células T respondedoras singénicas marcadas con CFSE a proporciones diferentes y APC alogénicas. Las células se co-cultivaron durante tres días en transwells o pocillos de cultivo normales, después de lo cual se analizó la proliferación de células T respondedoras usando citometría de flujo. Como se resume en la Fig. 5A, los Tregs inducidos tanto por BsB como por TGF- β cultivados en pocillos de cultivo normales inhibieron casi completamente la proliferación de células T respondedoras. La potencia de la actividad supresora de los Tregs inducidos por BsB fue comparable a la de los Tregs inducidos por TGF- β . Por el contrario, los Tregs generados por BsB o TGF- β no inhibieron significativamente la proliferación de células T respondedoras cuando las células T se separaron de los Tregs en un transwell. Sin estar vinculado a una teoría particular, la actividad supresora de Treg dependía del contacto célula-célula y no estaba mediada por citoquinas secretadas u otros factores. Apoyando este concepto, la inclusión de un anticuerpo frente a IL-10 (clon JES5-2A5) en el pocillo de cultivo normal no afectó la actividad supresora de los Tregs inducidos por BsB o TGF- β (Fig. 5B). La adición de un anticuerpo frente a TGF- β 1D11 tampoco afectó la actividad supresora de los Tregs inducidos por BsB, aunque redujo parcialmente la supresión por Tregs inducidos por TGF- β (Fig. 5B).

Ejemplo 6

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

Como se encontró que una proteína de fusión bifuncional que comprende CD80wa y LAG3 (BsB) que entrecruza CTLA-4 con el TCR (a través de MHCII) puede inducir la producción de Tregs Foxp3⁺ en un MLR alogénico, se examinó el potencial de BsB en la incitación de la producción de Tregs específicos de antígeno. Para investigar esta posibilidad, se purificaron células T OT-II sin activar a partir de ratones transgénicos que portan transgenes que codifican el TCR (subunidades α y β) específico para un péptido de ovoalbúmina de pollo (323-339) (Barnden et al., 1998) y se mezclaron con APC singénicas en presencia de Ova323-339. Después de 5 días de cultivo, se detectaron cantidades significativamente mayores de Tregs Foxp3⁺ en las células T OT-II que habían sido tratadas con BsB (Fig. 4A, panel medio de la izquierda) que por el mIgG control (Fig. 4A, panel superior de la izquierda) o por CTLA-4Ig (datos no mostrados). Esta inducción de Tregs se inhibió por la inclusión de un anticuerpo anti-

TGF- β en los cultivos (Fig. 4A, panel inferior de la izquierda). Sin estar vinculado a una teoría particular, la diferenciación estaba mediada por TGF- β producido endógenamente de una manera autocrina o paracrina. Los niveles de IL-2 estaban disminuidos mientras que los de IL-10 y TGF- β estaban incrementados en los medios de las células tratadas con BsB (Fig. 4A, paneles de la derecha).

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

Ejemplo 7

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

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

Ejemplo 8

La exposición a BsB mantiene la expresión de Foxp3⁺ en Tregs inducidos.

Se ha indicado que los Tregs inducidos *in vitro*, a diferencia de los Tregs naturales plenamente comprometidos, son menos estables y pueden perder la expresión de Foxp3⁺ después de un cultivo extenso en ausencia del inductor inicial (por ejemplo, TGF- β o ácido retinoico) (Selvaraj y Geiger, (2007) *J. Immunol.* 178:7667-7677). En el presente estudio, los Tregs inducidos por BsB mostraron una inestabilidad similar, con algunas células perdiendo la expresión de Foxp3 después de cultivos repetidos (Fig. 7). Para ensayar si la re-estimulación por BsB podía prolongar la expresión de Foxp3, los Tregs se indujeron en primer lugar recubriendo placas de 96 pocillos tanto con los anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 como con BsB. Los Tregs purificados se sometieron a una ronda adicional de cultivo en presencia o ausencia de BsB. La re-estimulación de los Tregs purificados con BsB permitió el mantenimiento de una gran población (~93% de los Tregs totales) de Tregs Foxp3⁺ (Fig. 7, panel inferior de la derecha), comparado con ~40% de expresión de Foxp3 en respuesta a la IgG control (Fig. 7, panel superior de la derecha).

Ejemplo 9**Farmacocinética de BsB en ratones.**

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

Otra explicación potencial para el aclaramiento rápido de BsB podría deberse a su captación por receptores de carbohidrato en células no diana. Los ejemplos de dichos receptores incluyen el receptor asialoglicoproteína (ASGPR) en hepatocitos (Weigel, 1994) y el receptor de manosa en macrófagos y células endoteliales del sistema reticuloendotelial (Pontow et al., 1992). El análisis de BsB usando el servidor NetNGlyc sugirió que tiene el potencial de portar hasta 10 cadenas laterales oligosacáridicas ligadas a asparagina por monómero (Fig. 9). Un

análisis de la composición de monosacáridos indicó que BsB contenía aproximadamente 37 residuos de manosa y pueden haberse usado todos los sitios de glicosilación ligados a asparagina predichos porque cada uno de estos glicanos oligosacáridicos ligados a asparagina contiene la estructura central de manosa con tres residuos de manosa (un total de 30 residuos de manosa). Además, también puede existir una pequeña cantidad de oligosacáridos de tipo con alta manosa para explicar los residuos de manosa extra. De hecho, se identificaron cantidades significativas de oligosacáridos sub-sialilados con tri- y tetra-antena ligados a asparagina, así como de tipo con alta manosa por espectrometría de masas de glicanos permetilados liberados de la proteína. Esta proyección también es consistente con el peso molecular de BsB de 100 kDa como se indica por un análisis de SDS-PAGE, a diferencia del peso calculado de BsB de 80 kDa. La presencia añadida de oligosacáridos contribuyó a la diferencia (20 kDa) en el peso molecular. Además, el BsB presentó una proporción de ácidos siálicos a galactosa de 0,68 (Fig. 9), lo que indica que los glicanos estaban incompletamente sialilados. Sin estar vinculado a una teoría particular, el aclaramiento mediado por carbohidratos de BsB por el ASGPR contribuía a su aclaramiento rápido de la circulación.

Ejemplo 10

Un curso corto de tratamiento con BsB retrasó el inicio de diabetes autoinmune en ratones NOD.

Como la CE_{50} de BsB para inducir Tregs *in vitro* se estimó que era aproximadamente 100 nM y su vida media circulante era corta ($t_{1/2}$ a ~12h), BsB se ensayó en ratones NOD en un paradigma de prevención tardía. Se administró a los ratones NOD BsB durante un intervalo corto (cada dos días durante 4 semanas) cuando tenían entre 9 y 12 semanas de edad. A esta edad, las células T autorreactivas y la insulinitis son ya evidentes pero los ratones todavía tienen que desarrollar diabetes manifiesta. Como se muestra en la Figura 10A, los ratones NOD tratados durante 2 semanas con BsB mostraron un incremento modesto pero estadísticamente significativo (25%) en el número de Tregs Foxp3⁺ en la sangre cuando se comparan con los controles tratados con disolución salina. Sin embargo, este incremento en Tregs fue transitorio ya que no se pudo detectar una diferencia en el número de Tregs después de 4 semanas de tratamiento o en puntos de tiempo posteriores. Un incremento transitorio similar en Tregs en órganos linfoides se observó previamente después de tratamiento de ratones NOD con un anticuerpo anti-CD3 (Nishio et al., 2010). Sin estar vinculado a una teoría particular, los Tregs inducidos por BsB pueden haber revertido a células T Foxp3⁻ después del cese del tratamiento. También pueden haber sido reclutados por tejidos diana específicos (por ejemplo, páncreas) para ejercer su función. Independientemente, este curso corto de tratamiento con BsB en un

paradigma de tratamiento de prevención tardía parece retrasar modestamente el inicio de la enfermedad y disminuir el número de ratones que presentan T1D manifiesta (Fig. 10B).

La respuesta modesta observada puede haberse debido a la presencia de insulinitis activa en los ratones NOD de 9 semanas de edad antes del comienzo de la terapia. Se ha mostrado que un

entorno inflamatorio favorece la conversión de células T activadoras en células Th17 y suprime su conversión a Tregs. También se ha mostrado que las citoquinas inflamatorias tales como IL-6 o IL-4 inhiben la conversión de Treg y estimulan la pérdida de la expresión de Foxp3⁺ en Tregs (Caretto et al., 2010; Kastner et al., 2010; Koenen et al., 2008). Para eludir estos retos,

los ratones NOD se trataron empezando en una edad más temprana (4 semanas de edad)

antes de la inducción manifiesta de células T auto-reactivas e insulinitis. También se incluyó CTLA-4Ig como un control positivo en este estudio ya que Bluestone y colegas (Lenschow et al., 1995) han demostrado un beneficio en el uso de este agente en este modelo; se usó mIgG2a

como un control negativo adicional a la disolución salina. A diferencia de los resultados en ratones más mayores (Fig. 10A), el número de Tregs Foxp3⁺ en la sangre periférica de ratones

NOD más jóvenes tratados durante 2 semanas con BsB no se incrementó por encima de a los que se había administrado disolución salina o mIgG (Fig. 11A). Sin estar vinculado a una teoría particular, esto podría ser porque el número de células T auto-reactivas en los ratones NOD de

4 semanas de edad (a diferencia de los ratones de 9-12 semanas de edad usados en el estudio anterior) era muy bajo. El número de Tregs específicos de antígeno inducidos probablemente

era demasiado bajo para registro más allá de los niveles basales presentes en los animales. Se observó una incidencia significativamente más baja de T1D en los ratones NOD a los que se administró BsB cuando se compara con los controles tratados con disolución salina antes de las

24 semanas de edad (Fig. 11B). Sin embargo, este beneficio se redujo en los puntos de tiempo posteriores.

Consistente con la publicación de ratones NOD a los que se administró CTLA-4Ig (Salomon et al., 2000), los niveles de Tregs en la sangre (Fig. 11A) estaban significativamente deprimidos presumiblemente por los efectos de CTLA-4Ig en la señalización de CD28/B7 (Tang et al., 2003). El tratamiento con CTLA-4Ig también agravó la enfermedad presentando los ratones un

inicio más temprano de la enfermedad (Fig. 11B) y una mayor penetrancia de la enfermedad cuando se compara con los controles tratados con disolución salina y mIgG (Fig. 11B). La

razón para la discrepancia entre estos descubrimientos y los publicados por Bluestone y colegas (Lenschow et al., 1995) no está clara pero puede deberse a las diferencias en el CTLA-4Ig usado o el régimen de dosificación empleado. En los presentes estudios, se usó una dosis

de 10 mg/kg de CTLA-4Ig humano (Orencia) en lugar de 2,5 mg/kg de CTLA-4Ig de ratón por

Bluestone y colegas. Además, el tratamiento con BsB no se extendió más allá de 7 semanas. Sin estar vinculado a una teoría particular, el uso de una dosis mayor de CTLA-4Ig rindió un bloqueo más completo de la señal co-estimuladora requerida para la homeostasis de Treg.

Ejemplo 11

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

Las razones potenciales para los beneficios modestos observados de BsB en el abordaje de la enfermedad en ratones NOD en los estudios anteriores incluyen la utilización de un curso relativamente corto de tratamiento, la potencia moderada de BsB en la inducción de la producción de Tregs (CE_{50} a > 100 nM), y la vida media circulante corta de BsB que puede haber limitado su exposición. Como la potencia y vida media circulante de BsB son intrínsecas a la molécula y por lo tanto no son factibles de cambiar fácilmente, se ensayó un curso más largo de tratamiento. Para este fin, los ratones NOD se trataron con BsB durante 10 semanas en lugar de 4 semanas empezando cuando los ratones tenían 4 semanas de edad. Como se muestra en la Figura 12A, los ratones NOD tratados durante 10 semanas con BsB presentaron un retraso significativo en el inicio de T1D. De forma importante, a las 35 semanas de edad, sólo el ~13% de los ratones NOD tratados con BsB desarrolló T1D comparado con más del 70% en los controles tratados con disolución salina. Así, el tratamiento extendido de los ratones NOD con BsB parecía haber protegido a los animales frente al desarrollo de diabetes autoinmune.

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

Debido a la heterogeneidad genética de los ratones NOD, un pequeño número de animales no tratados no desarrolló la enfermedad a las 35 semanas de edad. El análisis de los islotes de estos animales no diabéticos (de la cohorte tratada con disolución salina) mostró que las células β estaban intactas sin evidencia obvia de infiltración linfocítica o insulitis, (Fig. 12B, paneles a-c). Estaban presentes unas pocas células Treg Foxp3⁺ en los islotes de estos ratones (flechas en el panel c). Al contrario, los islotes de ratones NOD diabéticos (de la cohorte tratada con disolución salina) reveló la presencia de insulitis invasiva (Fig. 12B, panel d) y la destrucción completa de las células β (panel e). Además de las células T CD3⁺ y Tregs Foxp3⁺, también fueron evidentes grandes números de linfocitos distintos de células T (Fig. 12B, panel f). Se

observaron descubrimientos histopatológicos similares en los ratones correspondientes tratados con BsB que permanecieron sin enfermedad al final del estudio o que desarrollaron T1D durante el estudio. De forma interesante, en el ~50% de los islotes de los ratones NOD tratados con BsB que permanecieron no diabéticos, se observó evidencia de peri-insulitis (Fig. 12B, panel g); sin embargo, las células β se conservaron bien (Fig. 12B, panel h). La tinción con anticuerpos indicó que las células en la periferia de los islotes comprenden principalmente células T $CD3^+$ y Tregs. (Fig. 12B, panel i). Un aumento de una sección de la imagen (cuadrado rojo en la Fig. 12B, panel i) reveló claramente la presencia de numerosos Tregs $Foxp3^+$ (flechas amarillas en la Fig. 12B, panel j) que estaban intercalados con células T no $Foxp3^+$ pero $CD3^+$ (cabezas de flecha negra en la Fig. 12B, panel j) así como mononucleocitos distintos de células T (núcleos azules). El desarrollo de peri-insulitis se ha observado en ratones NOD jóvenes (4-10 semanas de edad) (Anderson y Bluestone, 2005) y en ratones más mayores tratados con otros agentes terapéuticos eficaces que retrasan o revierten T1D de inicio nuevo en ratones NOD (Chatenoud et al., 1994; Daniel et al., 2011; Simon et al., 2008; Vergani et al., 2010). Por lo tanto, un curso más largo de tratamiento de ratones NOD con BsB protegió a los animales frente al desarrollo de insulitis invasiva y T1D manifiesta. Sin estar vinculado a una teoría particular, esto estaba mediado, al menos en parte, por la inducción de novo y posiblemente in situ de Tregs específicos de antígeno de islotes.

El entrecruzamiento de CTLA-4 y TCR a través de MHCII usando una nueva proteína de fusión biespecífica (BsB) indujo eficazmente la producción de Tregs específicos de antígeno así como las citoquinas anti-inflamatorias, IL-10 y TGF- β . Los estudios previos mostraron que los Tregs son críticos para conferir tolerancia inmune y que los Tregs específicos de antígeno son más eficaces en modelos animales de enfermedades autoinmunes. BsB se evaluó adicionalmente en modelos animales de enfermedades autoinmunes, tal como T1D. Sin estar vinculado a una teoría particular, se propuso la hipótesis de que si BsB estimulaba la inducción de Tregs específicos de antígeno durante la fase temprana de activación de las células T autorreactivas en ratones NOD puede retrasar el inicio o parar la progresión de la enfermedad convirtiendo las células T autorreactivas que están experimentando activación en Tregs.

A pesar de que BsB presenta una potencia modesta (debido a su moderada afinidad por el MHC-II y TCR) y una vida media circulante corta (que limita su exposición), un curso corto de tratamiento retrasó de manera reproducible el inicio de T1D en ratones NOD tratados en una edad temprana (entre 4-6 semanas de edad) y cuando eran más mayores (entre 9-12 semanas de edad). Sin embargo, los beneficios observados fueron modestos y no sostenidos. Un curso más largo de tratamiento (10 semanas) de ratones NOD (entre 4 y 13 semanas de edad) con

BsB retrasó significativamente el inicio de la enfermedad y la incidencia de animales que desarrollan T1D. Sin estar vinculado a una teoría particular, este beneficio se impartió por la generación de novo de Tregs inducidos que fueron producidos localmente (por ejemplo, en el páncreas o ganglios linfáticos de drenaje pancreáticos) o distalmente que fueron entonces reclutados al páncreas para proteger los islotes de destrucción por células T autorreactivas y otros leucocitos distintos de células T. La tinción inmunohistoquímica de secciones de tejidos pancreáticos de ratones de 35 semanas de edad tratados con BsB que permanecieron no diabéticos indicó claramente un incremento en el número de Tregs Foxp3⁺ en la periferia de los islotes. Visualmente, pareció que previnieron la entrada en los islotes de las células T CD3⁺ y los linfocitos distintos de células T. Este fenómeno se observó en el ~50% de los islotes de ratones NOD tratados con BsB que permanecieron no diabéticos al final del estudio pero en ninguno de los islotes de los animales diabéticos en el grupo control. Los islotes de unos pocos ratones no diabéticos en el grupo control permanecieron sin infiltraciones linfocíticas y no tenían insulitis. Se sabe que debido a la heterogeneidad genética de los ratones NOD, unos pocos animales en una cohorte de este tamaño jamás desarrollan diabetes en este marco de tiempo. En el ~50% restante de animales no diabéticos en el grupo tratado con BsB, los islotes también carecían de infiltraciones linfocíticas y no tenían insulitis. Las posibilidades para este estado sin enfermedad de estos ratones incluyen el tratamiento con BsB y la base genética.

Consistente con los descubrimientos histopatológicos, se detectó un incremento pequeño pero estadísticamente significativo en el número de Tregs Foxp3⁺ en la sangre de animales tratados con BsB (tratados de 9-12 semanas de edad) cuando se compara con los controles no tratados. Este incremento no fue evidente en los ratones que empezaron el tratamiento a una edad más joven (4 semanas de edad). Sin estar vinculado a una teoría particular, esto puede ser porque más células T autorreactivas están experimentando activación en los ratones de 9 semanas de edad que en los de 4 semanas de edad. Los bajos niveles de células T autorreactivas en los ratones de 4 semanas de edad podrían haber impedido la detección de Tregs inducidos más allá del de en el entorno existente de Tregs. El incremento en Tregs también fue de naturaleza transitoria. Como una observación similar se observó en los animales sometidos a terapia anti-CD3 (Nishio et al., 2010), es posible que los Tregs inducidos fueran inestables y perdieran la expresión de Foxp3. Es más concebible que los Tregs fueran reclutados de la circulación a tejidos diana afectados. Al contrario, los ratones NOD tratados con CTLA-4Ig presentaron una disminución significativa en el número de Tregs circulantes. El tratamiento también agravó la enfermedad como se evidencia por un inicio acelerado de la enfermedad y una mayor incidencia de animales que presentan enfermedad manifiesta. Esto es consistente con

publicaciones previas que muestran que la ruta co-estimuladora está implicada en la homeostasis de Treg y que una ausencia de co-estimulación reduce la producción de Tregs. El bloqueo o inactivación de CD80 o CD86 en ratones NOD también resulta en un inicio temprano de T1D (Salomon et al., 2000; Tang et al., 2003).

- 5 La aparición de peri-insulitis se observa típicamente en el páncreas de ratones NOD entre las 4 y 9 semanas de edad. Si no se controla, resulta la insulitis invasiva que da lugar a la destrucción completa de las células β y al desarrollo de diabetes manifiesta entre las 12 y 35 semanas de edad. Los páncreas de los ratones NOD no diabéticos que habían sido tratados durante 10 semanas con BsB y analizados a las 35 semanas de edad presentaron evidencia de peri-
- 10 insulitis que pareció ser parada en su progresión. No se observó indicación de insulitis invasiva o destrucción excesiva de células β productoras de insulina. Existen otras publicaciones de diferentes intervenciones terapéuticas que retrasan o previenen la enfermedad de manera similar en ratones NOD (Shoda et al., 2005). Los resultados aquí son más parecidos a los publicados por Lee et al. (2010), que mostraron que la transferencia de células T $CD4^+CD25^-$
- 15 BDC2.5 diabetogénicas deplecionadas de Tregs $CD4^+CD25^+$ en ratones hembra NOD/SCID aceleró el desarrollo de insulitis invasiva cuando se compara con ratones a los que se administró células T $CD4^+$ totales que contienen Tregs $CD4^+CD25^+$. La insulitis invasiva estaba dominada en gran medida por la infiltración de células dendríticas (DC) en lugar de células T BDC2.5 per se. Los autores conjeturaron a partir de su estudio que los Tregs regulaban la
- 20 invasividad de DC en los islotes modulando, al menos en parte, la quimiotaxis de las DC en respuesta a las quimioquinas CCL19 y CCL21 secretadas por los islotes. Los patrones de tinción inmunohistoquímica para Tregs $Foxp3^+$, células T $CD3^+$ y leucocitos distintos de células T observados en las secciones pancreáticas de ratones NOD no diabéticos tratados con BsB son consistentes con sus descubrimientos (Fig. 12B). Sin estar vinculado a una teoría
- 25 particular, los Tregs producidos en los ratones NOD en respuesta a BsB actuaban probablemente para parar la migración de las células T autorreactivas y linfocitos distintos de células T a los islotes. Un curso más largo de tratamiento con BsB fue más eficaz porque esto generó una inducción más robusta y sostenida de Tregs. Que la estimulación continua de los Tregs inducidos con BsB en cultivos celulares extendiera la expresión de $Foxp3^+$ en Tregs
- 30 apoya este concepto (Karman et al., 2012).

La terapia celular usando Tregs recién aislados, expandidos *ex vivo* o inducidos *in vitro* en modelos animales de enfermedades autoinmunes o trasplantes de órganos ha demostrado que la transferencia adoptiva de Tregs puede restaurar el equilibrio de Tregs frente a células T efectoras, controlando de esta manera la autoinmunidad exuberante asociada con estas

enfermedades (Allan et al., 2008; Jiang et al., 2006; Riley et al., 2009; Tang et al., 2012). Sin embargo, el uso de transferencia adoptiva como una estrategia terapéutica presenta varios retos para su traslación a la clínica. En primer lugar, el número de Tregs autólogos que puede aislarse de la sangre periférica de un sujeto humano es limitante. Por lo tanto, frecuentemente es necesaria la expansión ex vivo de los Tregs, lo que puede alterar su funcionalidad y pureza. En segundo lugar, como los Tregs aislados son policlonales, pueden ejercer una función inmunosupresora generalizada en células T efectoras no diana. En tercer lugar, y lo más importante, la plasticidad de Tregs presenta un reto significativo (Bluestone et al., 2009; Zhou et al., 2009a). Se ha mostrado que los Tregs transferidos de manera adoptiva pueden perder la expresión de Foxp3 y rediferenciarse en células Th17 (Koenen et al., 2008) o células T de memoria patogénicas (Zhou et al., 2009b) lo que eleva el riesgo de agravar la autoinmunidad o inflamación. Consecuentemente, un terapéutico que induce la generación de Tregs de una manera específica de antígeno in situ es más ventajoso que la terapia con células Treg adoptiva. Los resultados presentados en la presente memoria demuestran la utilidad y eficacia de dicho agente (BsB) que entrecruza CTLA-4 con MHCII en el contexto de un modelo de ratón de T1D. La demostración combinada de producción de IL-10, TGF- β y Tregs en respuesta a tratamiento con BsB así como la eficacia en el modelo de ratón NOD de T1D tiene el potencial de proporcionar un nuevo concepto terapéutico. BsB también ofrece ventajas adicionales sobre otros moduladores inmunes ya que no afecta a las células T en reposo ni a otros linfocitos. Los números y porcentajes de células T CD4⁺ y células B CD19⁺ en la periferia permanecieron igual en todos nuestros estudios NOD. Sin estar vinculado a una teoría particular, esta estrategia es eficaz para retrasar o parar la progresión de la enfermedad. El desarrollo de variantes de BsB que son más potentes y que portan un perfil farmacocinético más favorable debería confirmar estos estudios. Así, este concepto también puede aplicarse hacia la gestión de otras enfermedades mediadas por inmunidad.

Los resultados indicados en la presente memoria se obtuvieron usando los métodos y materiales siguientes a no ser que se indique otra cosa.

Animales. Los ratones hembra de tipo salvaje C57BL/6 (H-2^b), BALB/c(H-2^d), ratones transgénicos OT-II que expresan la cadena α y cadena β del receptor de células T de ratón específico para ovoalbúmina de pollo 323-339(Ova₃₂₃₋₃₃₉) en una base genética C57BL/6, y los ratones hembra diabéticos no obesos (NOD/LtJ) se obtuvieron de The Jackson Laboratory. Los animales se mantuvieron en una instalación sin patógenos y los estudios se realizaron según las directrices expedidas por el U.S. Department of Health and Human Services (NIH

Publication No 86-23) y por el comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Genzyme.

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

Construcción y producción de la proteína de fusión biespecífica BsB. La construcción y la expresión de la proteína de fusión biespecífica (BsB) que comprende los dominios extracelulares de CD80w88a y LAG-3 así como el Fc de IgG2a de ratón (CD80wa-LAG-3-Fc, BsB) se han descrito previamente (Karman et al., 2012).

Ensayos Biacore y análisis de la composición de monosacáridos. Se usó Biacore para comparar la unión de BsB y mIgG2a al receptor de Fc neonatal de ratón (FcRn). Brevemente, se inmovilizó un chip CM5 con ~1.430 RU de FcRn-HPC4 de ratón usando química de amina. Cada muestra se diluyó de manera seriada 1:2 hasta concentraciones finales de entre 200 y 6,25 nM en PBSP (PBS con 0,005% Tensioactivo P-20), pH 6,0 y se inyectó durante 3 min en duplicado, seguido de 3 min de lavado con tampón de disociación. La superficie se regeneró con 10mM de borato de sodio y 1M NaCl, pH 8,5. La composición de carbohidrato de los monosacáridos de BsB se analizó según el protocolo descrito por Zhou et al. (Zhou et al., 2011).

Aislamiento de células T sin activar. Se purificaron células T sin activar de los bazos y ganglios linfáticos de ratones hembra de 8-12 semanas de edad BALB/c o OT-II por separación magnética seguido de separación celular activada por fluorescencia. Las células se seleccionaron en primer lugar negativamente por separación celular magnética (Miltenyi Biotech) y después se separaron como células CD4⁺CD25⁻CD62L^{hi}CD44^{low} hasta una pureza mayor de 98%.

Ensayo de inducción de Treg específicos de antígeno. Los ensayos en un entorno MLR alogénico se realizaron como se ha publicado previamente (Karman et al., 2012). Para la activación de células T específicas de antígeno, se mezclaron 10⁵ células T OT-II sin activar en placas de 96 pocillos de fondo redondo con 10⁵ APC singénicas irradiadas en presencia de Ova₃₂₃₋₃₂₉ a 0,5 µg/ml y 1 µg/ml de anti-CD28 soluble (clon 37.51, eBioscience). Las construcciones de ensayo, IgG2a de ratón o CTLA-4Ig de ratón se añadieron a las células cultivadas a una concentración saturante de 100 µg/ml. Las células se cultivaron durante 5 días para inducir la producción de Tregs y se analizaron por citometría de flujo. Se recogieron los

medios para análisis de IL-2, IL-10 y TGF- β usando kits de ELISA según las instrucciones del fabricante. Para evaluar la proliferación de las células T, se marcaron células T OT-II sin activar purificadas con 5 μ M CFSE durante 5 min a 37°C. Entonces se lavaron para eliminar CFSE no unido y se usaron en los ensayos de inducción de Treg como se ha descrito anteriormente. Las

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

10 *Mediciones farmacocinéticas de BsB en ratones.* La farmacocinética de BsB se determinó en ratones C57BL/6 de 8 semanas de edad. Se administraron 20 mg/kg de BsB a los ratones por inyección intraperitoneal. Se recogió sangre por sangrado de la vena safena a 1 hr, 5 hr, 24 hr, 48 hr, y 72 hr después de la administración. Se midieron los niveles de BsB a cada punto de tiempo usando un ensayo ELISA. Brevemente, 100 μ l (1 μ g/ml) de un anticuerpo anti-CD80 de

15 ratón en PBS se utilizaron para recubrir placas de 96 pocillos y se incubó toda la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con 5% suero fetal bovino durante 1 h, después de lo cual se lavaron 4 veces con PBS. Se añadieron 100 μ l de las muestras de sangre a varias diluciones a los pocillos. Las placas se incubaron durante 2 hr con agitación suave a temperatura ambiente y se lavaron 4 veces con PBS. Se añadió anticuerpo anti-LAG-3 de ratón biotinilado (1 μ g/ml) y se

20 incubó durante 2hr. Las placas se lavaron 4 veces con PBS después de lo cual se añadió estreptavidina-HRP. Después de 30 min, las placas se lavaron 6 veces con PBS y se desarrollaron para medición colorimétrica. Como estándares se usaron BsB purificado diluido en diluyente de ensayo a varias concentraciones.

Tratamiento de ratones NOD con BsB. En el tratamiento de curso corto, se trataron ratones

25 hembra NOD de 4 semanas de edad con disolución salina, 20 mg/kg BsB, 20 mg/kg IgG2a de ratón, ó 10 mg/kg CTLA-4Ig humano (Orencia) tres veces a la semana por inyección intraperitoneal durante un periodo de 2,5 semanas. Para el modelo de prevención tardía, se trataron ratones NOD de 9-12 semanas de edad con disolución salina ó 20 mg/kg BsB como anteriormente durante for 4 semanas. Para el tratamiento de curso más largo, se trataron

30 ratones NOD con BsB o disolución salina como anteriormente durante 10 semanas desde la edad de 4 semanas hasta 13 semanas. Se monitorizaron los niveles de glucosa sin ayunar semanalmente empezando a las 8 semanas de edad. Se consideró que los ratones eran diabéticos cuando sus lecturas de glucosa eran mayores de 300 mg/dL durante tres lecturas consecutivas. Se examinaron los Tregs Foxp3⁺ en sangre periférica después de dos semanas

de tratamiento por citometría de flujo. Brevemente, se bloquearon 50 µl de sangre completa con anti-FcγRIIb y FcγRIII no marcados (clon 93, eBioscience) durante 20 min. Las células se tiñeron posteriormente con anticuerpo anti-CD4 marcado fluorescentemente durante 30 min y se lavaron. Las células sanguíneas rojas se lisaron usando disolución Lisante FACS (BD Biosciences) durante 5 min. Después de lavar, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron con un anticuerpo anti-Foxp3 marcado con FITC durante 30 min como se ha descrito anteriormente. Los páncreas se diseccionaron a la mitad con una mitad fijada en formalina tamponada neutra y la otra se puso en compuesto OCT y se congeló en nieve carbónica.

Análisis estadístico. Las incidencias acumulativas de ratones NOD que presentan T1D e hiperglucemia después del tratamiento con BsB o controles se compararon usando el ensayo de rango logarítmico (Cox-Mantel) en Prism 5 (Graphpad, city and state). Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Análisis histopatológico. Los páncreas fijados en formalina tamponada neutra se tiñeron para células CD3, Foxp3⁺ usando un procesador automático. Las secciones de tejido se desparafinaron usando xileno-etanol, los antígenos se recuperaron incubando durante 25 min en tampón citrato y se bloquearon con suero. Los portas se incubaron con un anticuerpo anti-CD3 durante 45 min, seguido de un polímero con peroxidasa de rábano de cabra anti-conejo durante 20 min. La visualización del cromógeno de CD3 se obtuvo incubando con tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobenzidina durante 2-4 min. Para detectar Foxp3⁺, se re-bloquearon las secciones con suero, seguido de exposición a un anticuerpo anti-Foxp3 durante 45 min. Los portas se incubaron con un anticuerpo de conejo anti-IgG de rata durante 30 min, seguido de polímero con fosfatasa alcalina de cabra anti-conejo. La visualización del cromógeno se consiguió usando Fast Red durante 10 min. Las secciones de tejido se contratiñeron usando hematoxilina durante 2 min y se lavaron 3 veces con 0,05% Tween-20/disolución salina tamponada con Tris entre las etapas. Las secciones seriadas adyacentes se tiñeron usando un anticuerpo anti-insulina como se ha descrito anteriormente. Se hicieron fotografías usando un microscopio fluorescente Nikon Eclipse E800 con una cámara digital unida de Diagnostic Inc. y las imágenes se adquirieron usando el software Spot Advanced.

Secuencias

Leyenda

CD80w88a = ligando CTLA-4

IgG2a = región Fc de IgG2

G9 = Gly 9

Lag-3 = ligando MHC

H6 = His 6

SEQ ID NO. 1:

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

Secuencia de nucleótidos de la construcción sucedánea de ratón (Gen1):

ATGGCTTGCAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTCCAAGGCT
CATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTCTTTCACAAGTGTCTTCAGATGTTGATGAACAAC
GTCCAAGTCAGTGAAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCGTTACAACTCTCCTCATGAAGATG
10 AGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACATGACAAAGTGGTGCTGTCTGTCATTGCTGG
GAAACTAAAAGTGGCGCCCGAGTATAAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTC
TTATCATCCTGGGCCTGGTCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCTGTFCAAAAGAA
GGAAAGAGGAACGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAGCTGACT
TCTCTACCCCCAACATAACTGAGTCTGGAAACCCATCTGCAGACACTAAAAGGATTACCTGC
15 TTTGCTFCCGGGGGITTCCCAAAGCCTCGCTTCTCTTGTTGGAAAATGGAAGAGAATTACC
TGGCATCAATACGACAATTTCCAGGATCCTGAATCTGAATTGTACACCATTAGTAGCCAAC
TAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGTGTCTCATFAAATATGGAGATGCTCAC
GTGTCAGAGGACTTCACCTGGGAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATGC
AAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAA
20 GGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGA
GGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTACTCACAGCTCAG
ACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCC
AGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGCCCTCC
CAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATA
25 TGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTC
ACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAA
ACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTG
AGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGCTCAGTGGTCCACGAG
GGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAAGGCGGTGGC
30 GGCGGAGGCGGTGGCGGTGGGCCTGGGAAAGAGCTCCCCGTGGTGTGGGCCCAGGAGG
GAGCTCCCGTCCATCTTCCCTGCAGCCTCAAATCCCCAACCTGGATCCTAACTTTCTACG
AAGAGGAGGGGTTATCTGGCAACATCAACCAGACAGTGGCCAACCCACTCCCATCCCGGC
CCTTGACCTTCACCAGGGGATGCCCTCGCCTAGACAACCCGCACCCGGTCGCTACACGGT
GCTGAGCGTGGCTCCAGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCAGCCCCTGCATCCCCACGTGC

AGCTGGAGGAGCGCGGCCTCCAGCGCGGGGACTTCTCTCTGTGGTTGCGCCCAGCTCTG
CGCACCGATGCGGGCGAGTACCACGCCACCGTGCGCCTCCCGAACCGCGCCCTCTCCTG
CAGTCTCCGCCTGCGCGTCCGGCCAGGCCTCGATGATTGCTAGTCCCTCAGGAGTCCTCAA
GCTGTCTGATTGGGTCCTTTTGAAGTCTCCTTCAGCCGTCCTGACCGCCCAGTCTCTGTG
5 CACTGGTTCCAGGGCCAGAACCGAGTGCCTGTCTACAACTCACCGCGTCATTTTTTAGCTG
AAACTTTCCTGTTACTGCCCCAAGTCAGCCCCCTGGACTCTGGGACCTGGGGCTGTGTCT
CACCTACAGAGATGGCTTCAATGTCTCCATCACGTACAACCTCAAGGTTCTGGGTCTGGAG
CCCGTAGCCCACCATCACCATCATCACTGA

SEQ ID NO. 2:

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

Secuencia de proteína traducida de la construcción sucedánea de ratón (Gen1):

MACNCQLMQDTPLLKFPCLILLFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESE
DRIYWQKHDKVVLVSVIAGKLKVAPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTYSVQKKERGTYE
15 VKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDP
EELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI
FPPKIKDVLMLISLSPMVTVCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSAL
PIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVT
DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGL
20 HNHHTTKSFSRTPGKGGGGGGGGGGPGKELPVVWAQEGAPVHLPCSLKSPNLDPNFLRRGG
VIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGGLRSGRQPLPHVQLEERG
LQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCSLRLRVGQASMIASPSGVKLKSDWVLLNC
SFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNsprhFLAETFLLLPQVSPLDSGTWGCVLTYRDGFNVSIT
YNLKVLGLEPVAHHHHHH

25 **SEQ ID NO. 3:**

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

Secuencia de nucleótidos de la construcción sucedánea de ratón (Gen 2):

ATGGCTTGCAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTCCAAGGCT
CATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTCGTCTTTCACAAGTGTCTTCAGATGTTGATGAACAACT
30 GTCCAAGTCAGTGAAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCGTTACAACCTCTCCTCATGAAGATG
AGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACATGACAAAGTGGTGCTGTCTGTCTGCTGCTGG
GAAACTAAAAGTGGCGCCCGAGTATAAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTC
TTATCATCCTGGGCCTGGTCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCTGTTCAAAGAA
GGAAAGAGGAACGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAGCTGACT

TCTCTACCCCCAACATAACTGAGTCTGGAAACCCATCTGCAGACACTAAAAGGATTACCTGC
 TTTGCTTCCGGGGGTTTCCCAAAGCCTCGCTTCTCTTGGTTGGAAAATGGAAGAGAATTAC
 CTGGCATCAATACGACAATTTCCCAGGATCCTGAATCTGAATTGTACACCATTAGTAGCCAA
 CTAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGTGTCTCATTAAATATGGAGATGCTCA
 5 CGTGTCAAGAGGACTTCACCTGGGGCGGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTGGGCCTGGG
 AAAGAGCTCCCCGTGGTGTGGGCCCAGGAGGGAGCTCCCGTCCATCTTCCCTGCAGCCTC
 AAATCCCCCAACCTGGATCCTAACTTTCTACGAAGAGGAGGGGTTATCTGGCAACATCAAC
 CAGACAGTGGCCAACCCACTCCCATCCCGGCCCTTGACCTTCACCAGGGGATGCCCTCGC
 CTAGACAACCCGCACCCGGTCGCTACACGGTGCTGAGCGTGGCTCCAGGAGGCCTGCGC
 10 AGCGGGAGGCAGCCCCTGCATCCCCACGTGCAGCTGGAGGAGCGCGGCCTCCAGCGCG
 GGGACTTCTCTCTGTGGTTGCGCCCAGCTCTGCGCACCGATGCGGGCGAGTACCACGCCA
 CCGTGCGCCTCCCGAACCGCGCCCTCTCCTGCAGTCTCCGCCTGCGCGTCGGCCAGGCC
 TCGATGATTGCTAGTCCCTCAGGAGTCCTCAAGCTGTCTGATTGGGTCCCTTTTGAAGTCTC
 CTTCAGCCGTCCTGACCGCCCAGTCTCTGTGCACTGGTTCCAGGGCCAGAACCGAGTGCC
 15 TGTCTACAACTCACCGCGTCATTTTTTCTAGCTGAACTTTCTGTTACTGCCCAAGTCAGCC
 CCCTGGACTCTGGGACCTGGGGCTGTGTCCTCACCTACAGAGATGGCTTCAATGTCTCCAT
 CACGTACAACCTCAAGGTTCTGGGTCTGGAGCCCGTAGCCCCCAGAGGGCCACAATCAA
 GCCCTGTCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATC
 TTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATGGTCACATGTGTGG
 20 TGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTCGTGAACAACGTGG
 AAGTACTCACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGT
 CAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGT
 CAACAACAAAGCCCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTA
 AGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCA
 25 CTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAA
 CGGGAAAACAGAGCTAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTAC
 TTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCT
 GCTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTC
 CGGGTAAATGA

30 **SEQ ID NO. 4:**

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

Secuencia de proteína traducida de la construcción sucedánea de ratón (Gen 2):

MACNCQLMQDTPLLKFPCPRILLFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESE
 DRIYWQKHDKVLSVIAGKLKVAPEYKNRTLYDNTTYSLIILGLVLSDRGTYSVQKKERGTYE

VKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDP
 ESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWGGGGGGGGGGPGKELPVVWAQEGAP
 VHLP CSLKSPNLDPNFLRRGGVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAP
 GGLRSGRQPLPHVQLEERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCSLRLRVGQ
 5 ASMIASPSGVKLSDWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNsprhFLAETFLLLPQVSP
 LDSGTWGCVLTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKI
 KDVLMI SLSPMVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQ
 DWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMP
 EDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHH
 10 TTKSFSRTPGK

SEQ ID NO. 5:

**CTLA-4 BsB secuencia de nucleótidos de la construcción humana de tipo salvaje =
 (CD80(aa1-234)- G9-Lag-3(aa27-262-IgGla(aa240-471) humano**

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAATTTCTTTT
 15 AGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTCAAGGTGTTATCCACGTGACCAAGGA
 AGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGTTTCTGTTGAAGAGCTGGCACAA
 ACTCGCATCTACTGGCAAAGGAGAAGAAAATGGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGA
 ATATATGGCCCGAGTACAAGAACCGGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTG
 ATCCTGGCTCTGCGCCCATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAA
 20 AAGACGCTTTCAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCC
 TACACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAACCTTAATATTAGAAGGATAATTTGCTCAAC
 CTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAGAATTAATGCC
 ATCAACACAACAGTTTCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGCTGTTAGCAGCAAACCTGGA
 TTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTCATCAAGTATGGACATTTAAGAGTGA
 25 ATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGCGGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCGGGA
 GCTGAGGTCCCGGTGGTGTGGGCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCCAGCTCCCCTGCAGCCC
 CACAATCCCCCTCCAGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATCA
 GCCAGACAGTGGCCCGCCCGCTGCCGCCCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCACC
 CGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGGCCAGGCCCGCCGCTACACGGTGCTGAGCGTGGG
 30 TCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCCCTGCAGCCCCGCGTCCAGCTGGATGAGC
 GCGGCCGGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGCCCAGCCCGGCGCGCGGACGC
 CGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGGGACCGCGCCCTCTCCTGCCGCCTCCGTC
 TGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGACTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGACT
 GGGTCATTTTGAAGTGTCTCCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTCG

GAACCGGGGCCAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCCTTAGCGGAAA
GCTTCCTCTTCCTGCCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCCTCA
CCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGGGTCTGCTGGT
GCCCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGC
5 ACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC
10 ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTATACAGCAAGCTCACCG
TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
15 TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO. 6:

**CTLA-4 BsB secuencia de proteína traducida de la construcción humana de tipo salvaje =
(CD80(aa1- 234)-G9-Lag-3(aa27-262-IgGla(aa240-471) humano**

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSV EELAQTRI
20 YWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKRE
HLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETE
LYAVSSKLDNFMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTGGGGGGGGSGAEVPWWAQEGAP
AQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTV
LSVGPGGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLR
25 LRLGQASMTASPPGSLRASDVVVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAES
FLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
30 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 7:

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

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAATTTCTTTC
AGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTCTCACTTCTGTTTCAGGTGTTATCCACGTGACCAAGGA
AGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCTGTGGTCACAATGTTTCTGTTGAAGAGCTGGCACAA
ACTCGCATCTACTGGCAAAGGAGAAGAAAATGGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGA
5 ATATAGCCCCCGAGTACAAGAACCGGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTG
ATCCTGGCTCTGCGCCCATCTGACGAGGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAA
AAGACGCTTTCAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCC
TACACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAACCTTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCTCAAC
CTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAGAATTAAATGCC
10 ATCAACACAACAGTTGCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGCTGTTAGCAGCAAAGTGG
ATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTCATCAAGTATGGACATTTAAGAGTG
AATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGCGGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGG
AGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGGGCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCC
CCACAATCCCCCTCCAGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATC
15 AGCCAGACAGTGGCCCCGCCCCGCTGCCGCCCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCAC
CCGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCCGAGCGCTACACGGTGCTGAGCGTGG
GTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGTCCAGCTGGATGAG
CGCGGCCGGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGCCCAGCCCCGCGCGCGGACG
CCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGGGACCGCGCCCTCTCCTGCCGCCTCCGT
20 CTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGACTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGAC
TGGGTCATTTTGAAGTGTCTCTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTC
GGAACCGGGGCCAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCCTTAGCGGAA
AGCTTCCTCTTCTGCCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCCTC
ACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGGGTCTGCTGGT
25 GCCCCGGGGCTCCGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACAAGCCCACCGAGCCCAGC
ACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
30 GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTATACAGCAAGCTCACCG

TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO. 8:

CTLA-4 BsB construcción humana secuencia de proteína traducida variante 1 =
5 **(CD80W84A/S190A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgGlaN596/297Q(aa240-471**
humano)

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRI
YWQKEKKMVLTMMSGDMNIAPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKRE
HLAEVTL SVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVAQDPETE
10 LYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHRLRVNQTFNWNTTGGGGGGGGGGSGAEVVPVWAQEGA
PAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPERYT
VLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRL
RLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHHLAES
FLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPPSPAPELL
15 GGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 9:

20 **CTLA-4 BsB construcción humana secuencia de nucleótidos variante 2 =**
(CD80W84A/S190AS201A(aal -234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgGlaN596/297Q(aa240-
471) humano

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAATTTCTTTC
AGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTTCAGGTGTTATCCACGTGACCAAGGA
25 AGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGTTTCTGTTGAAGAGCTGGCACAA
ACTCGCATCTACTGGCAAAAGGAGAAGAAAATGGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGA
ATATAGCCCCCGAGTACAAGAACCGGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTG
ATCCTGGCTCTGCGCCCATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTICTGAAGTATGAAA
AAGACGCTTTCAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCC
30 TACACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAACCTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCTCAAC
CTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAGAATTAAATGCC
ATCAACACAACAGTTGCCCAAGATCCTGAAACTGAGCTCTATGCTGTTGCCAGCAAACCTGG
ATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTCATCAAGTATGGACATTTAAGAGTG
AATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGCGGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGG

AGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGGGCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCCAGCTCCCCTGCAGCC
 CCACAATCCCCCTCCAGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATC
 AGCCAGACAGTGGCCCGCCCGCTGCCGCCCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCAC
 CCGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGGCCCAGGCCCGAGCGCTACACGGTGCTGAGCGTGG
 5 GTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCCTGCAGCCCCGCGTCCAGCTGGATGAG
 CGCGGCCGGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGCCCAGCCCGGCGCGCGGACG
 CCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGGGACCGCGCCCTCTCCTGCCGCCTCCGT
 CTGCGCCTGGGGCCAGGCCTCGATGACTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGAC
 TGGGTCATTTTGAACTGCTCCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTC
 10 GGAACCGGGGCCAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCACTTAGCGGAA
 AGCTTCCTCTTCCTGCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGGCCCTGGGGCTGCATCCTC
 ACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGGGTCTGCTGGT
 GCCCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGACAAAACCTCACACAAGCCCACCGAGCCCAGC
 ACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC
 15 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
 GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
 CGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
 GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC
 ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
 20 CCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
 TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC
 AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTATACAGCAAGCTCACCG
 TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
 TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

25 **SEQ ID NO. 10:**

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

30 MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRI
 YWQKEKKMVLTMMSGDMNIAPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKRE
 HLAEVTLVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVAQDPETE
 LYAVASKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTGGGGGGGGGSGAEVPVWWAQEGA
 PAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPERYT
 VLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRL

RLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAES
FLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPSPAPELL
GGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
5 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 11:

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

humano

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAATTTCTTTC
AGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTTCAGGTGTTATCCACGTGACCAAGGA
AGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGTTTCTGTTGAAGAGCTGGCACAA
ACTCGCATCTACTGGCAAAGGAGAAGAAAATGGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGA
15 ATATATGGCCCGAGTACAAGAACCGGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTG
ATCCTGGCTCTGCGCCCATCTGACGAGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAA
AAGACGCTTTCAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCC
TACACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAACCTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCTCAAC
CTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAGAATTAAATGCC
20 ATCAACACAACAGTTGCCAAGATCCTGAAACTGCCCTCTATGCTGTTAGCAGCAAACCTGG
ATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTCATCAAGTATGGACATTTAAGAGTG
AATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGCGGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCGGG
AGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGGGCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCCAGCTCCCCTGCAGCC
CCACAATCCCCCTCCAGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATC
25 AGCCAGACAGTGGCCCGCCCGCTGCCGCCCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCAC
CCGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCCAGGCCCGAGCGCTACACGGTGCTGAGCGTGG
GTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCCTGCAGCCCCGCGTCCAGCTGGATGAG
CGCGGCCGGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGCCCAGCCCGGCGCGCGGACG
CCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGGGACCGCGCCCTCTCCTGCCGCCTCCGT
30 CTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGACTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGAC
TGGGTCATTTTGAACTGCTCCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTC
GGAACCGGGGCCAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCACTTAGCGGAA
AGCTTCCTCTTCCTGCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCCTC
ACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGGGTCTGCTGGT

GCCCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGTGACAAACTCACACAAGCCCACCGAGCCCAGC
ACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC
ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
5 CGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
CCCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTAC
10 AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTATACAGCAAGCTCACCG
TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO. 12:

CTLA-4 BsB construcción humana secuencia de proteína traducida variante 3 =
15 (CD80E196A/S190A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgG1 aN596/297Q(aa240-471)
humano

MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVVEELAQTRI
YWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKRE
HLAEVTLSVKADFPTPSISDFEIPTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVAQDPETA
20 LYAVSSKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTGGGGGGGGGSGAEVPVWVAQEGA
PAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAPGHPLAPGHPAAPSSWGPRPERYT
VLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRL
RLRLGQASMTASPPGSLRASDVVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPHHHLAE
SFLFLPQVSPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKCDKHTHTSPPSPAPEL
25 LGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQ
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 13:

30 CTLA-4 BsB construcción humana secuencia de nucleótidos variante 4 =
(CD80E196A/S190AS201A(aa1-234)-G9-Lag-3R316/75E(aa27-262-IgG1a N596/297Q(aa240-
471) humano

ATGGGCCACACACGGAGGCAGGGAACATCACCATCCAAGTGTCCATACCTCAATTTCTTTC
AGCTCTTGGTGCTGGCTGGTCTTTCTCACTTCTGTTTCAGGTGTTATCCACGTGACCAAGGA

AGTGAAAGAAGTGGCAACGCTGTCCTGTGGTCACAATGTTTCTGYFGAAGAGCTGGCACAA
ACTCGCATCTACTGGCAAAGGAGAAGAAAATGGTGCTGACTATGATGTCTGGGGACATGA
ATATATGGCCCGAGTACAAGAACCGGACCATCTTTGATATCACTAATAACCTCTCCATTGTG
ATCCTGGCTCTGCGCCCATCTGACGAGGGGCACATACGAGTGTGTTGTTCTGAAGTATGAAA
5 AAGACGCTTTCAAGCGGGAACACCTGGCTGAAGTGACGTTATCAGTCAAAGCTGACTTCCC
TACACCTAGTATATCTGACTTTGAAATTCCAACCTCTAATATTAGAAGGATAATTTGCTCAAC
CTCTGGAGGTTTTCCAGAGCCTCACCTCTCCTGGTTGGAAAATGGAGAAGAATTAAATGCC
ATCAACACAACAGTTGCCCAAGATCCTGAAACTGCCCTCTATGCTGTTGCCAGCAAACCTGG
ATTTCAATATGACAACCAACCACAGCTTCATGTGTCTCATCAAGTATGGACATTTAAGAGTG
10 AATCAGACCTTCAACTGGAATACAACCGGCGGTGGCGGCGGAGGCGGTGGCGGTTCCGG
AGCTGAGGTCCCGGTGGTGTGGGCCCAGGAGGGGGCTCCTGCCAGCTCCCCTGCAGCC
CCACAATCCCCCTCCAGGATCTCAGCCTTCTGCGAAGAGCAGGGGTCACTTGGCAGCATC
AGCCAGACAGTGGCCCGCCCGCTGCCGCCCCCGGCCATCCCCTGGCCCCCGGCCCTCAC
CCGGCGGCGCCCTCCTCCTGGGGGCCAGGCCCGAGCGCTACACGGTGCTGAGCGTGG
15 GTCCCGGAGGCCTGCGCAGCGGGAGGCTGCCCTGCAGCCCCGCGTCCAGCTGGATGAG
CGCGGCCGGCAGCGCGGGGACTTCTCGCTATGGCTGCGCCCAGCCCGGCGCGCGGACG
CCGGCGAGTACCGCGCCGCGGTGCACCTCAGGGACCGCGCCCTCTCCTGCCGCCTCCGT
CTGCGCCTGGGCCAGGCCTCGATGACTGCCAGCCCCCAGGATCTCTCAGAGCCTCCGAC
TGGGTCATTTTGAAGTGCTCCTTCAGCCGCCCTGACCGCCCAGCCTCTGTGCATTGGTTTC
20 GGAACCGGGGCCAGGGCCGAGTCCCTGTCCGGGAGTCCCCCATCACCCTTAGCGGAA
AGCTTCCTCTTCCTGCCCAAGTCAGCCCCATGGACTCTGGGCCCTGGGGCTGCATCCTC
ACCTACAGAGATGGCTTCAACGTCTCCATCATGTATAACCTCACTGTTCTGGGTCTGCTGGT
GCCCCGGGGCTCCGAGCCCAAATCTTGACAAAACCTCACACAAGCCACCGAGCCAGC
ACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC
25 ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT
GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACCAGAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG
30 CCCCATCTCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTAC
AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTATACAGCAAGCTCACCG
TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC
TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO. 14:

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

5 MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKEVATLSCGHNVSVEELAQTRI
YWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKRE
HLAEVTL SVKADFPTPSISDFEIPSTNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVAQDPETA
LYAVASKLDFNMTTNHSFMCLIKYGHRLRVNQTFNWNTTGGGGGGGGSGAEVPVWVAQEGA
PAQLPCSPTIPLQDLSLLRRAGVTINQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPERYT
10 VLSVGP GGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRL
RLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHHLAES
FLFLPQVSPMDSGPWGCI LTYRDGFNVSIMYNLTVLGLLVPRGSEPKSCDKTHTSPPSPAPELL
GGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
15 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO. 15

CD80 humano

MGHTRRQGTS PSKCPYLNFF QLLVLAGLSH FCSGVIHVTKEVKEVATLSC GHNVSVEELA
20 QTRIWQKEK K MVLTMMSGD MNIWPEYKNR TIFDITNNLS IVILALRPSD EGTYECVVLK
YEKDAFKREH LAEVTLSVKA DFPTPSISDF EIPSTNIRRI ICSTSGGFPE PHLSWLENGE
ELNAINTTVS QDPETELYAV SSKLDFNMTT NHSFMCLIKY GHRLRVNQTFN WNTTKQEHFP
DNLLPSWAIT LISVNGIFVI CCLTYCFAPR CRERRRNERL RRESVRPV

SEQ ID NO. 16

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

Secuencia de nucleótidos de la construcción sucedánea de ratón (BsBA; CD80wa-Fc):

ATGGCTTGCAATTGTCAGTTGATGCAGGATACACCACTCCTCAAGTTTCCATGTCCAAGGCT
CATTCTTCTCTTTGTGCTGCTGATTCGTCTTTCACAAGTGTCTTCAGATGTTGATGAACAAC
GTCCAAGTCAGTGAAAGATAAGGTATTGCTGCCTTGCCGTTACAACCTCTCCTCATGAAGATG
30 AGTCTGAAGACCGAATCTACTGGCAAAAACATGACAAAGTGGTGCTGTCTGTCTGCTGCTGG
GAAACTAAAAGTGGCGCCCGAGTATAAGAACCGGACTTTATATGACAACACTACCTACTCTC
TTATCATCCTGGGCGCTGGTCCTTTCAGACCGGGGCACATACAGCTGTGTCTGTTCAAAAGAA
GGAAAGAGGAACGTATGAAGTTAAACACTTGGCTTTAGTAAAGTTGTCCATCAAAGCTGACT
TCTCTACCCCCAACATAACTGAGTCTGGAAACCCATCTGCAGACACTAAAAGGATTACCTGC

TTTGCTTCCGGGGGTTTCCCAAAGCCTCGCTTCTCTTGGTTGGAAAATGGAAGAGAATTAC
 CTGGCATCAATACGACAATTTCCCAGGATCCTGAATCTGAATTGTACACCATTAGTAGCCAA
 CTAGATTTCAATACGACTCGCAACCACACCATTAAGTGTCTCATTAAATATGGAGATGCTCA
 CGTGTCAAGAGGACTTCACCTGGGAGCCCAGAGGGGCCACAATCAAGCCCTGTCCTCCATG
 5 CAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATC
 AAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATGGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCG
 AGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTCGTGAACAACGTGGAAGTACTCACAGCTCA
 GACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATC
 CAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGCCCTC
 10 CCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTAT
 ATGTCTTGCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGT
 CACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTA
 AACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCT
 GAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGCTCAGTGGTCCACGA
 15 GGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAAGGCGGTGG
 CGGCGGAGGCGGTGGCGGTGGGCCTGGGAAAGAGCTGGGTCTGGAGCCCGTAGCCCAC
 CATCACCATCATCACTGA

SEQ ID NO. 17**BsBA (CD80wa-Fc) Proteína = CD80w88a(aa1-235)-IgG2a(aa241-474) de ratón**

20 **Secuencia de proteína traducida de la construcción sucedánea de ratón (BsBA; CD80wa-Fc):**

MACNCQLMQDTPLLKFPCPRLILLFVLLIRLSQVSSDVDEQLSKSVKDKVLLPCRYNSPHEDESE
 DRIYWQKHDKVVLVSVIAGKLVKVAPEYKNRTLYDNTTYSLLILGLVLSDRGTYSVQKKERGTYE
 VKHLALVKLSIKADFSTPNITESGNPSADTKRITCFASGGFPKPRFSWLENGRELPGINTTISQDP
 25 ESELYTISSQLDFNTTRNHTIKCLIKYGDAHVSEDFTWEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI
 FPPKIKDVLMLSLSPMVTVCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSAL
 PIQHQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVT
 DFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGSGSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVHEGL
 HNHHTTKSFSRTPGKGGGGGGGGGGPGKELGLEPVAHHHHHH

30

Otras Realizaciones

A partir de la descripción anterior, será evidente que pueden hacerse a la invención descrita en la presente memoria variaciones y modificaciones para adaptarla a varios usos y condiciones. Dichas realizaciones también están en el alcance de las reivindicaciones siguientes.

El recitado de un listado de elementos en cualquier definición de una variable en la presente memoria incluye las definiciones de esa variable como cualquier elemento único o combinación (o subcombinación) de los elementos listados. El recitado de una realización en la presente memoria incluye esa realización como cualquier realización única o en combinación con cualesquiera otras realizaciones o partes de éstas.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta especificación se incorporan en la presente memoria por referencia en el mismo grado que si cada patente y publicación independiente se indicara que se incorpora específicamente e individualmente por referencia.

10 Referencias

Los documentos siguientes se citan en la presente memoria.

Allan, S.E., R. Broady, S. Gregori, M.E. Himmel, N. Locke, M.G. Roncarolo, R. Bacchetta, y M.K. Levings. 2008. CD4+ T-regulatory cells: toward therapy for human diseases. *Immunol Rev* 223:391-421.

15 Anderson, B.E., J.M. McNiff, C. Matte, I. Athanasiadis, W.D. Shlomchik, y M.J. Shlomchik. 2004. Recipient CD4+ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease. *Blood* 104:1565-1573.

Anderson, M.S., y J.A. Bluestone. 2005. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23:447-485.

20 Barnden, M.J., J. Allison, W.R. Heath, y F.R. Carbone. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76:34-40.

Baroja, M.L., L. Vijayakrishnan, E. Bettelli, P.J. Darlington, T.A. Chau, V. Ling, M. Collins, B.M. Carreno, J. Madrenas, y V.K. Kuchroo. 2002. Inhibition of CTLA-4 function by the regulatory subunit of serine/threonine phosphatase 2A. *J Immunol* 168:5070-5078.

25 Bettini, M., A.L. Szymczak-Workman, K. Forbes, A.H. Castellaw, M. Selby, X. Pan, C.G. Drake, A.J. Korman, y D.A. Vignali. 2011. Cutting edge: accelerated autoimmune diabetes in the absence of LAG-3. *J Immunol* 187:3493-3498.

Blair, P.J., J.L. Riley, B.L. Levine, K.P. Lee, N. Craighead, T. Francomano, S.J. Perfetto, G.S.

30 Gray, B.M. Carreno, y C.H. June. 1998. CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J Immunol* 160:12-15.

Bluestone, J.A., C.R. Mackay, J.J. O'Shea, y B. Stockinger. 2009. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 9:811-816.

- Caretto, D., S.D. Katzman, A.V. Villarino, E. Gallo, y A.K. Abbas. 2010. Cutting edge: the Th1 response inhibits the generation of peripheral regulatory T cells. *J Immunol* 184:30-34.
- Chatenoud, L., E. Thervet, J. Primo, y J.F. Bach. 1994. Anti-CD3 anticuerpo induces long-term remission of manifiesta autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:123-127.
- 5 Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, y S.M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886.
- Chuang, E., T.S. Fisher, R.W. Morgan, M.D. Robbins, J.M. Duerr, M.G. Vander Heiden, J.P. Gardner, J.E. Hambor, M.J. Neveu, y C.B. Thompson. 2000. The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity* 13:313-322.
- 10 Daniel, C., B. Weigmann, R. Bronson, y H. von Boehmer. 2011. Prevention of diabetes tipo 1 in mice by tolerogenic vaccination with a strong agonist insulin mimetope. *J Exp Med* 208:1501-1510.
- 15 Fife, B.T., M.D. Griffin, A.K. Abbas, R.M. Locksley, y J.A. Bluestone. 2006. Inhibition of T cell activation and autoimmune diabetes using a B cell surface-linked CTLA-4 agonist. *J Clin Invest* 116:2252-2261.
- Gonzalez-Rey, E., A. Fernandez-Martin, A. Chorny, y M. Delgado. 2006. Vasoactive intestinal peptide induces CD4+,CD25+ T regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 54:864-876.
- 20 Griffin, M.D., D.K. Hong, P.O. Holman, K.M. Lee, M.J. Whitters, S.M. O'Herrin, F. Fallarino, M. Collins, D.M. Segal, T.F. Gajewski, D.M. Kranz, y J.A. Bluestone. 2000. Blockade of T cell activation using a surface-linked single-chain anticuerpo to CTLA-4 (CD152). *J Immunol* 164:4433-4442.
- 25 Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M.L. Belladonna, R. Bianchi, M.C. Fioretti, y P. Puccetti. 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 3:1097-1101.
- Guntermann, C., y D.R. Alexander. 2002. CTLA-4 suppresses proximal TCR signaling in resting human CD4(+) T cells by inhibiting ZAP-70 Tyr(319) phosphorylation: a potential role for tyrosine phosphatases. *J Immunol* 168:4420-4429.
- 30 Ise, W., M. Kohyama, K.M. Nutsch, H.M. Lee, A. Suri, E.R. Unanue, T.L. Murphy, y K.M. Murphy. 2010. CTLA-4 suppresses the pathogenicity of self antigen-specific T cells by cell-intrinsic and cell-extrinsic mechanisms. *Nat Immunol* 11:129-135.

- Jain, N., H. Nguyen, C. Chambers, y J. Kang. 2010. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1524-1528.
- Jiang, S., R.I. Lechler, y G. Lombardi. 2006. CD4+CD25+ regulatory T-cell therapy. *Expert review of clinical immunology* 2:387-392.
- Karandikar, N.J., C.L. Vanderlugt, T.L. Walunas, S.D. Miller, y J.A. Bluestone. 1996. CTLA-4: a negative regulator of enfermedad autoinmune. *J Exp Med* 184:783-788.
- Karman, J., J.L. Jiang, N. Gumlaw, H. Zhao, J. Campos-Rivera, J. Sancho, J. Zhang, C. Jiang, S.H. Cheng, y Y. Zhu. 2012. Ligation of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 to the TCR inhibits T cell activation and directs differentiation into FOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem*
- Kastner, L., D. Dwyer, y F.X. Qin. 2010. Synergistic effect of IL-6 and IL-4 in driving fate revision of natural Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 185:5778-5786.
- Kehrl, J.H., L.M. Wakefield, A.B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M.B. Sporn, y A.S. Fauci. 1986. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 163:1037-1050.
- Koenen, H.J., R.L. Smeets, P.M. Vink, E. van Rijssen, A.M. Boots, y I. Joosten. 2008. Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112:2340-2352.
- Krummel, M.F., y J.P. Allison. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182:459-465.
- Krummel, M.F., y J.P. Allison. 1996. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med* 183:2533-2540.
- Lenschow, D.J., S.C. Ho, H. Sattar, L. Rhee, G. Gray, N. Nabavi, K.C. Herold, y J.A. Bluestone. 1995. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal anticuerpo treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* 181:1145-1155.
- Linsley, P.S., y P. Golstein. 1996. Lymphocyte activation: T-cell regulation by CTLA-4. *Curr Biol* 6:398-400.
- Linsley, P.S., J.L. Greene, W. Brady, J. Bajorath, J.A. Ledbetter, y R. Peach. 1994. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1:793-801.
- Marie, J.C., J.J. Letterio, M. Gavin, y A.Y. Rudensky. 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201:1061-1067.

- Masteller, E.L., M.R. Warner, Q. Tang, K.V. Tarbell, H. McDevitt, y J.A. Bluestone. 2005. Expansion of functional endogenous antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from nonobese diabetic mice. *J Immunol* 175:3053-3059.
- McDevitt, H., S. Singer, y R. Tisch. 1996. The role of MHC class II genes in susceptibility and resistance to type I diabetes mellitus in the NOD mouse. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 28:287-288.
- Murai, M., O. Turovskaya, G. Kim, R. Madan, C.L. Karp, H. Cheroutre, y M. Kronenberg. 2009. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 10:1178-1184.
- 10 Nishio, J., M. Feuerer, J. Wong, D. Mathis, y C. Benoist. 2010. Anti-CD3 therapy permits regulatory T cells to surmount T cell receptor-specified peripheral niche constraints. *J Exp Med* 207:1879-1889.
- Ohata, J., T. Miura, T.A. Johnson, S. Hori, S.F. Ziegler, y H. Kohsaka. 2007. Enhanced efficacy of regulatory T cell transfer against increasing resistance, by elevated Foxp3 expression induced in arthritic murine hosts. *Arthritis Rheum* 56:2947-2956.
- 15 Onodera, T., M.H. Jang, Z. Guo, M. Yamasaki, T. Hirata, Z. Bai, N.M. Tsuji, D. Nagakubo, O. Yoshie, S. Sakaguchi, O. Takikawa, y M. Miyasaka. 2009. Constitutive expression of IDO by dendritic cells of mesenteric lymph nodes: functional involvement of the CTLA-4/B7 and CCL22/CCR4 interactions. *J Immunol* 183:5608-5614.
- 20 Paterson, A.M., y A.H. Sharpe. 2010. Taming tissue-specific T cells: CTLA-4 reins in self-reactive T cells. *Nat Immunol* 11:109-111.
- Pentcheva-Hoang, T., J.G. Egen, K. Wojnoonski, y J.P. Allison. 2004. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 21:401-413.
- Pontow, S.E., V. Kery, y P.D. Stahl. 1992. Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 137B:221-244.
- 25 Qu, H.Q., J.P. Bradfield, S.F. Grant, H. Hakonarson, y C. Polychronakos. 2009. Remapping the type I diabetes association of the CTLA4 locus. *Genes and immunity* 10 Suppl 1:S27-32.
- Riley, J.L., C.H. June, y B.R. Blazar. 2009. Human T regulatory cell therapy: take a billion or so and call me in the morning. *Immunity* 30:656-665.
- Roncarolo, M.G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, y M.K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28-50.
- 30 Roopenian, D.C., y S. Akilesh. 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7:715-725.

- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, y M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various enfermedad autoinmunes. *J Immunol* 155:1151-1164.
- 5 Salomon, B., D.J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, y J.A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.
- Shoda, L.K., D.L. Young, S. Ramanujan, C.C. Whiting, M.A. Atkinson, J.A. Bluestone, G.S. Eisenbarth, D. Mathis, A.A. Rossini, S.E. Campbell, R. Kahn, y H.T. Kreuwel. 2005. A
- 10 comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity* 23:115-126.
- Simon, G., M. Parker, V. Ramiya, C. Wasserfall, Y. Huang, D. Bresson, R.F. Schwartz, M. Campbell-Thompson, L. Tenace, T. Brusko, S. Xue, A. Scaria, M. Lukason, S. Eisenbeis, J. Williams, M. Clare-Salzler, D. Schatz, B. Kaplan, M. Von Herrath, K. Womer, y M.A. Atkinson.
- 15 2008. Murine antithymocyte globulin therapy alters disease progression in NOD mice by a time-dependent induction of immunoregulation. *Diabetes* 57:405-414.
- Steinman, R.M., D. Hawiger, y M.C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
- Tang, Q., J.A. Bluestone, y S.M. Kang. 2012. CD4(+)Foxp3(+) regulatory T cell therapy in
- 20 transplantation. *Journal of molecular cell biology* 4:11-21.
- Tang, Q., K.J. Henriksen, M. Bi, E.B. Finger, G. Szot, J. Ye, E.L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi, y J.A. Bluestone. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199:1455-1465.
- Tang, Q., K.J. Henriksen, E.K. Boden, A.J. Tooley, J. Ye, S.K. Subudhi, X.X. Zheng, T.B. Strom,
- 25 y J.A. Bluestone. 2003. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 171:3348-3352.
- Tarbell, K.V., L. Petit, X. Zuo, P. Toy, X. Luo, A. Mqadmi, H. Yang, M. Suthanthiran, S. Mojssov, y R.M. Steinman. 2007. Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med* 204:191-201.
- 30 Taylor, P.A., C.J. Lees, y B.R. Blazar. 2002. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 99:3493-3499.

- Tivol, E.A., F. Borriello, A.N. Schweitzer, W.P. Lynch, J.A. Bluestone, y A.H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541-547.
- Tsunawaki, S., M. Sporn, A. Ding, y C. Nathan. 1988. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 334:260-262.
- Ueda, H., J.M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D.B. Rainbow, K.M. Hunter, A.N. Smith, G. Di Genova, M.H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R.C. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H.E. Rance, V. Everett, L.J. Smink, A.C. Lam, H.J. Cordell, N.M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J.F. Hess, M.L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadia, R. Nithiyananthan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K.M. Gillespie, D.E. Undlien, K.S. Ronningen, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D.A. Savage, A.P. Maxwell, D.J. Carson, C.C. Patterson, J.A. Franklyn, D.G. Clayton, L.B. Peterson, L.S. Wicker, J.A. Todd, y S.C. Gough. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to enfermedad autoinmune. *Nature* 423:506-511.
- Vergani, A., F. D'Addio, M. Jurewicz, A. Petrelli, T. Watanabe, K. Liu, K. Law, C. Schuetz, M. Carvello, E. Orsenigo, S. Deng, S.J. Rodig, J.M. Ansari, C. Staudacher, R. Abdi, J. Williams, J. Markmann, M. Atkinson, M.H. Sayegh, y P. Fiorina. 2010. A novel clinically relevant strategy to abrogate autoimmunity and regulate alloimmunity in NOD mice. *Diabetes* 59:2253-2264.
- Wahl, S.M., N. McCartney-Francis, J.B. Allen, E.B. Dougherty, y S.F. Dougherty. 1990. Macrophage production of TGF-beta and regulation by TGF-beta. *Ann N Y Acad Sci* 593:188-196.
- Walunas, T.L., C.Y. Bakker, y J.A. Bluestone. 1996. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med* 183:2541-2550.
- Walunas, T.L., y J.A. Bluestone. 1998. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J Immunol* 160:3855-3860.
- Walunas, T.L., D.J. Lenschow, C.Y. Bakker, P.S. Linsley, G.J. Freeman, J.M. Green, C.B. Thompson, y J.A. Bluestone. 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405-413.
- Waterhouse, P., J.M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K.P. Lee, C.B. Thompson, H. Griesser, y T.W. Mak. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* 270:985-988.
- Weigel, P.H. 1994. Galactosyl and N-acetylgalactosaminyl homeostasis: a function for mammalian asialoglycoprotein receptors. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 16:519-524.

- Wicker, L.S., J.A. Todd, y L.B. Peterson. 1995. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* 13:179-200.
- Yamagiwa, S., J.D. Gray, S. Hashimoto, y D.A. Horwitz. 2001. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 166:7282-7289.
- 5 Zhao, D., C. Zhang, T. Yi, C.L. Lin, I. Todorov, F. Kandeel, S. Forman, y D. Zeng. 2008. In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease. *Blood* 112:2129-2138.
- Zheng, S.G., J.D. Gray, K. Ohtsuka, S. Yamagiwa, y D.A. Horwitz. 2002. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol* 169:4183-4189.
- 10 Zhou, X., S. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, y J.A. Bluestone. 2009a. Plasticity of CD4(+) FoxP3(+) T cells. *Curr Opin Immunol* 21:281-285.
- Zhou, X., S.L. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martinez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, y J.A. Bluestone. 2009b. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* 10:1000-1007.
- 15

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la inducción de tolerancia de una célula T por la puesta en contacto de dicha célula T con una célula presentadora de antígeno que está presentando un péptido derivado de dicho antígeno formando un complejo con una molécula MHC y dicho agente biológico biespecífico.
2. Uso de un agente biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad autoinmune y rechazo de trasplante.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad autoinmune es diabetes tipo 1 (T1D).
4. Uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el ligando específico para CTLA-4 se selecciona de un anticuerpo específico para CTLA-4, y CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2).
5. Uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el ligando específico para el complejo pMHC se selecciona de un anticuerpo anti-MHC y LAG-3.
6. Uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el ligando específico para CTLA-4 y el ligando específico para el complejo pMHC están espaciados entre sí por un conector.
7. Uso según la reivindicación 6, en el que el conector es uno o más de una secuencia de poliaminoácido y un dominio Fc de anticuerpo.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que la secuencia de poliaminoácido es G9 (Gly-9).
9. Uso según la reivindicación 4, en el que el ligando específico para CTLA-4 es CD80.
10. Uso según la reivindicación 9, en el que CD80 está mutado para incrementar la especificidad para CTLA-4.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que CD80 es CD80 humano que comprende al menos una de las mutaciones W84A, K71G, K71V, S109G, R123S, R123D, G124L, S190A, S201A, R63A, M81A, N97A y E196A.
12. Uso según la reivindicación 11, en el que CD80 comprende la mutación W84A o E196A de CD80 humano.
13. Uso según la reivindicación 5, en el que el ligando específico para el complejo MHC es LAG-3.

14. Uso según la reivindicación 13, en el que LAG-3 está mutado para incrementar la especificidad para pMHCII.
15. Uso según la reivindicación 14, en el que LAG-3 es LAG-3 humano que comprende al menos una de las mutaciones R73E, R75A, R75E y R76E .
- 5 16. Uso según la reivindicación 15, en el que LAG-3 comprende la mutación R75A o R75E.
17. Un agente biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC.
18. Un agente biológico biespecífico según la reivindicación 17, en el que el ligando específico para CTLA-4 se selecciona de un anticuerpo específico para CTLA-4, y CD80 (B7-1)
- 10 o CD86 (B7-2).
19. Un agente biológico biespecífico según la reivindicación 17 o reivindicación 18, en el que el ligando específico para el complejo pMHC se selecciona de un anticuerpo anti-MHC y LAG-3.
20. Un agente biológico biespecífico según cualquier reivindicación anterior, en el que el
- 15 ligando específico para CTLA-4 y el ligando específico para el complejo pMHC están espaciados entre sí por un conector.
21. Un agente biológico biespecífico según la reivindicación 20, en el que el conector es uno o más de una secuencia de poliaminoácido y un dominio Fc de anticuerpo.
22. Un agente biológico biespecífico según la reivindicación 21, en el que la secuencia de
- 20 poliaminoácido es G9 (Gly-9).
23. Un agente biológico biespecífico según la reivindicación 18, en el que el ligando específico para CTLA-4 es CD80.
24. Un agente biológico biespecífico según la reivindicación 23, en el que CD80 está mutado para incrementar la especificidad para CTLA-4.
- 25 25. Un agente biológico biespecífico según la reivindicación 24, en el que CD80 es CD80 humano que comprende al menos una de las mutaciones W84A, K71G, K71V, S109G, R123S, R123D, G124L, S190A, S201A, R63A, M81A, N97A y E196A .
26. Un agente biológico biespecífico según la reivindicación 25, en el que CD80 comprende la mutación W84A o E196A de CD80 humano.
- 30 27. Un agente biológico biespecífico según la reivindicación 19, en el que el ligando específico para el complejo MHC es LAG-3.
28. Un agente biológico biespecífico según la reivindicación 27, en el que LAG-3 está mutado para incrementar la especificidad para pMHCII.

29. Un agente biológico biespecífico según la reivindicación 28, en el que LAG-3 es LAG-3 humano que comprende al menos una de las mutaciones R73E, R75A, R75E y R76E .

30. Un agente biológico biespecífico según la reivindicación 29, en el que LAG-3 comprende la mutación R75A o R75E.

5 31. Un método para inducir tolerancia de una célula T a un antígeno, que comprende poner en contacto dicha célula T con una célula presentadora de antígeno que está presentando un péptido derivado de dicho antígeno formando un complejo con una molécula MHC y un agente biológico biespecífico según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 30.

10 32. Un método para tratar a un sujeto que padece una afección seleccionada de una enfermedad autoinmune o rechazo de trasplante, que comprende las etapas de administrar a un sujeto que lo necesita un agente biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 30.

15 33. Un método según la reivindicación 32, en el que el agente biológico biespecífico se administra en combinación con un inmunosupresor o modulador adicional.

20 34. Un método según la reivindicación 32 o reivindicación 33, en el que la enfermedad autoinmune se selecciona de diabetes tipo 1 (T1D), Lupus Eritematoso Sistémico (SLE), Artritis Reumatoide (RA) , enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), colitis ulcerosa (UC), enfermedad de Crohn (CD), esclerosis múltiple (MS), escleroderma, pénfigo vulgar (PV), psoriasis, dermatitis atópica, enfermedad celiaca, enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves (tiroides), síndrome de Sjogren, síndrome de Guillain-Barre, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Addison, granulomatosis de Wegener, esclerosis biliar primaria, colangitis esclerosante, hepatitis autoinmune, polimialgia reumática, fenómeno de Raynaud, arteritis temporal, arteritis de células gigantes, anemia hemolítica autoinmune, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa. enfermedad de Behcet, cirrosis biliar primaria, uveitis, miocarditis, fiebre reumática, espondilitis anquilosante, glomerulonefritis, sarcoidosis, dermatomiositis, miastenia grave, polimiositis, alopecia areata, y vitiligo.

25

RESUMEN

La presente invención proporciona un agente biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC.

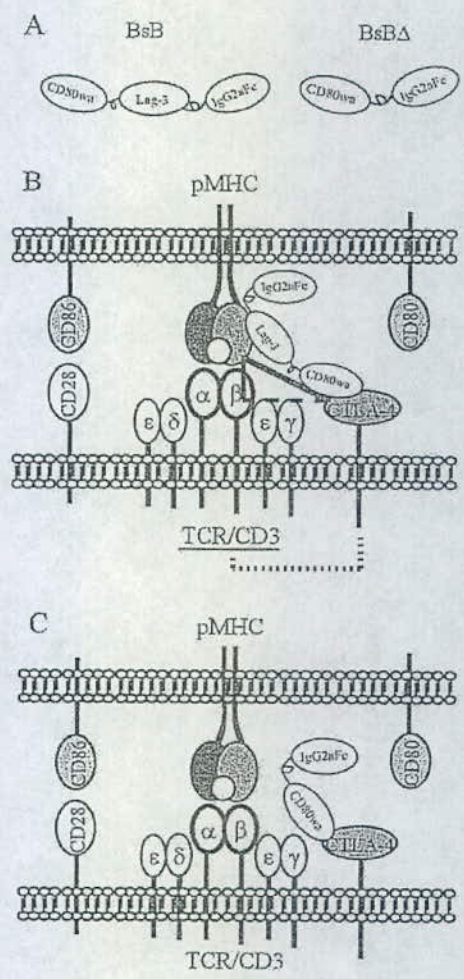


Figure 1

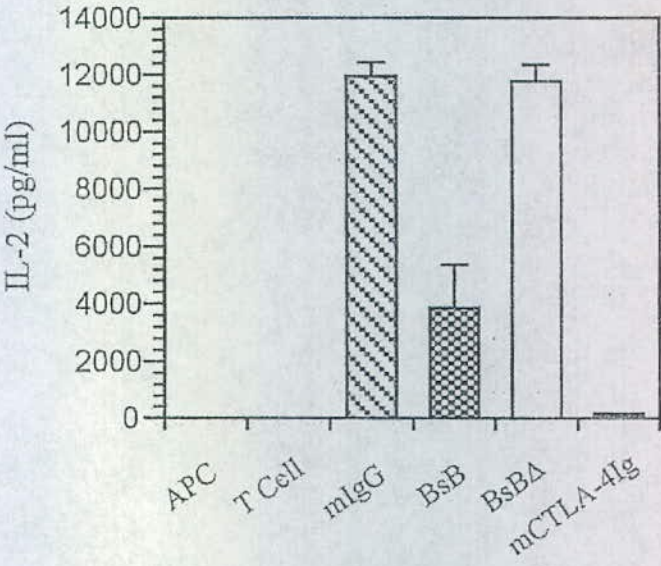
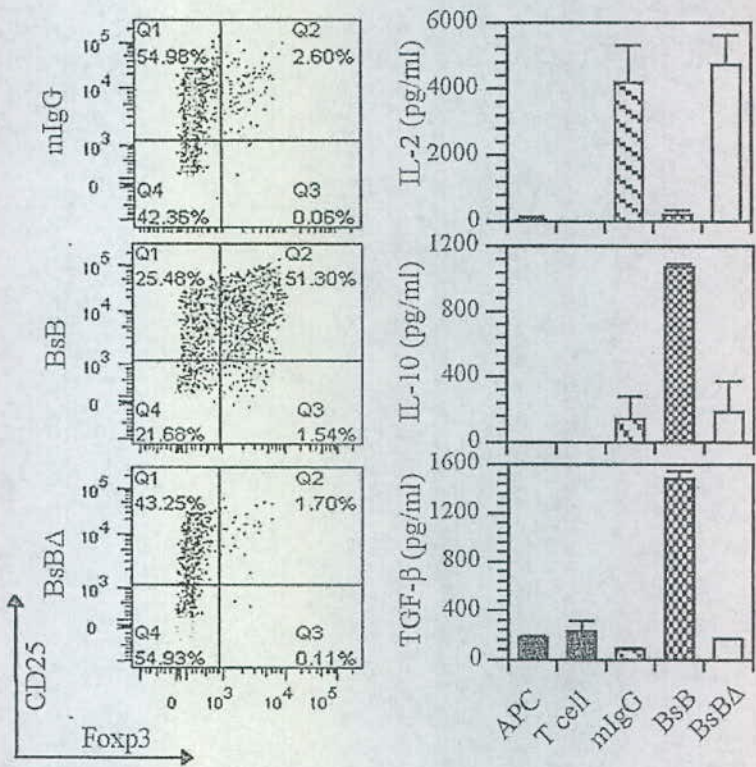


Figure 2

A



B

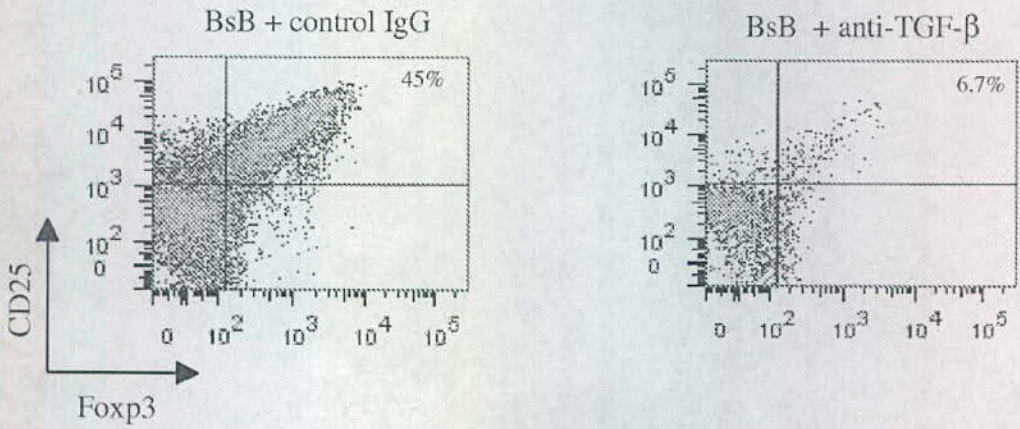


Figure 3

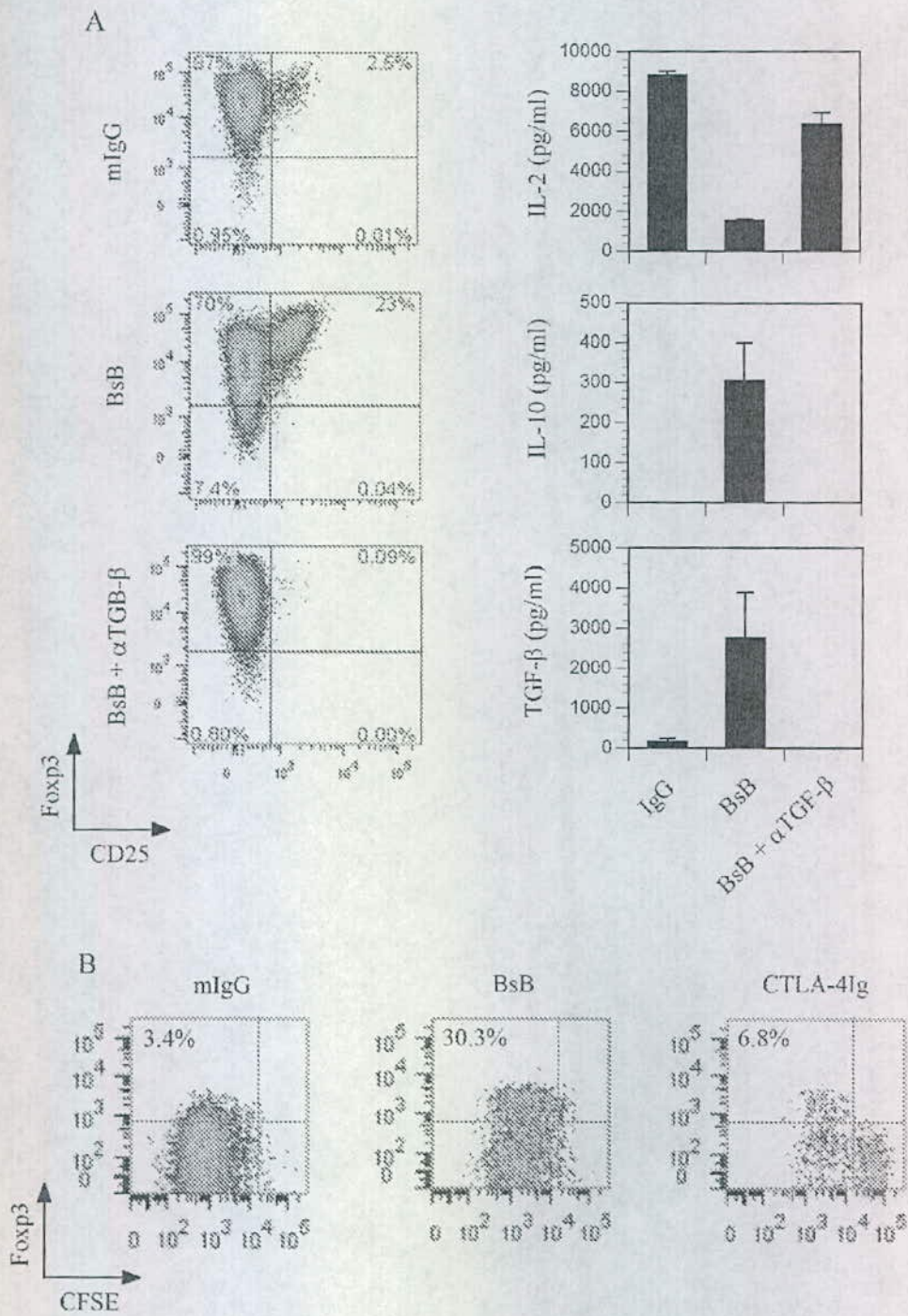


Figure 4

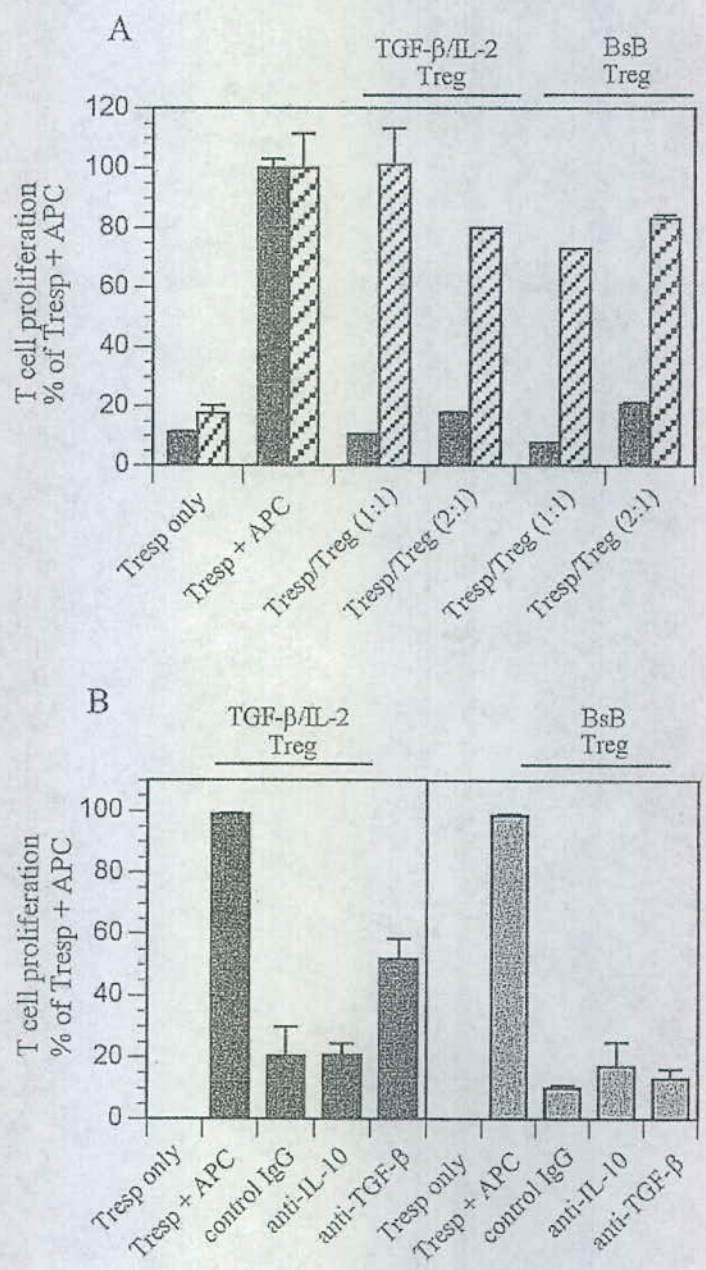


Figure 5

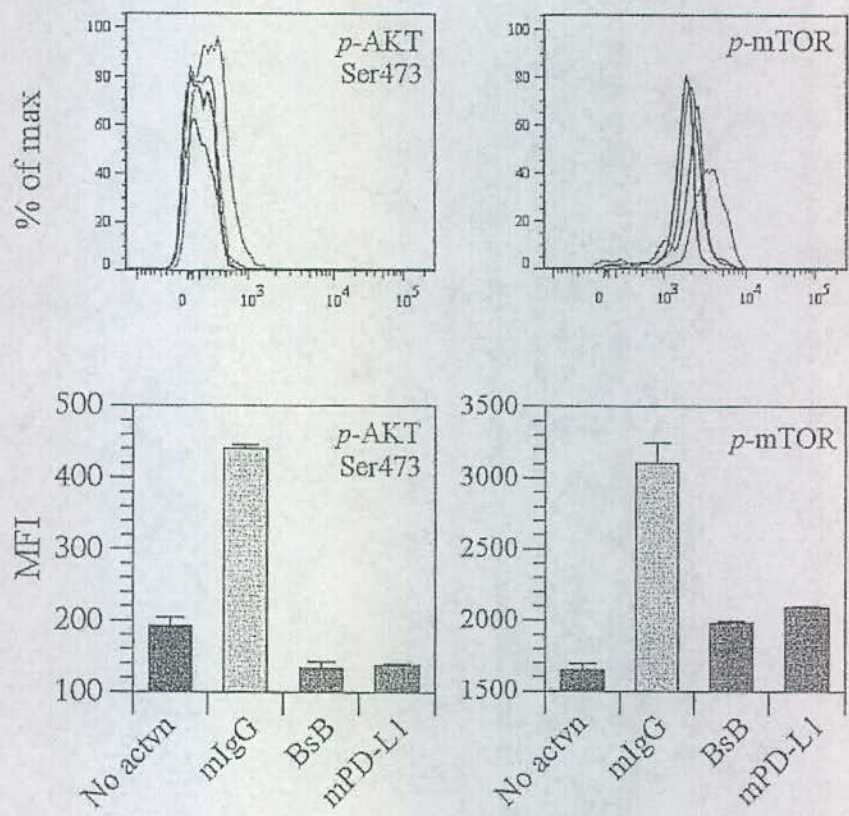


Figure 6

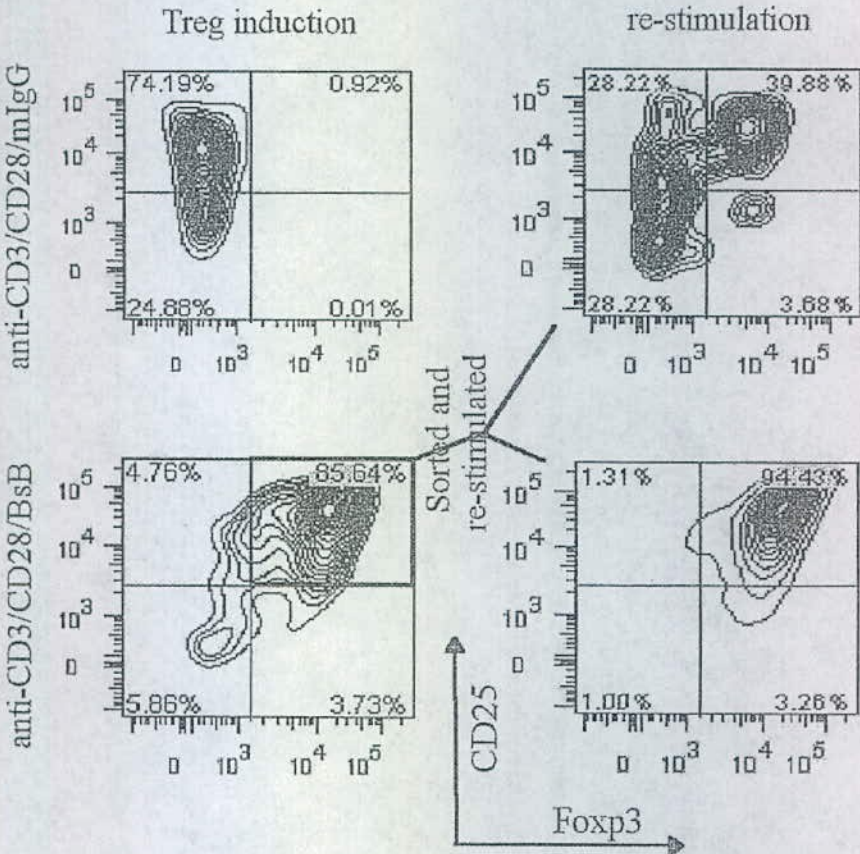


Figure 7

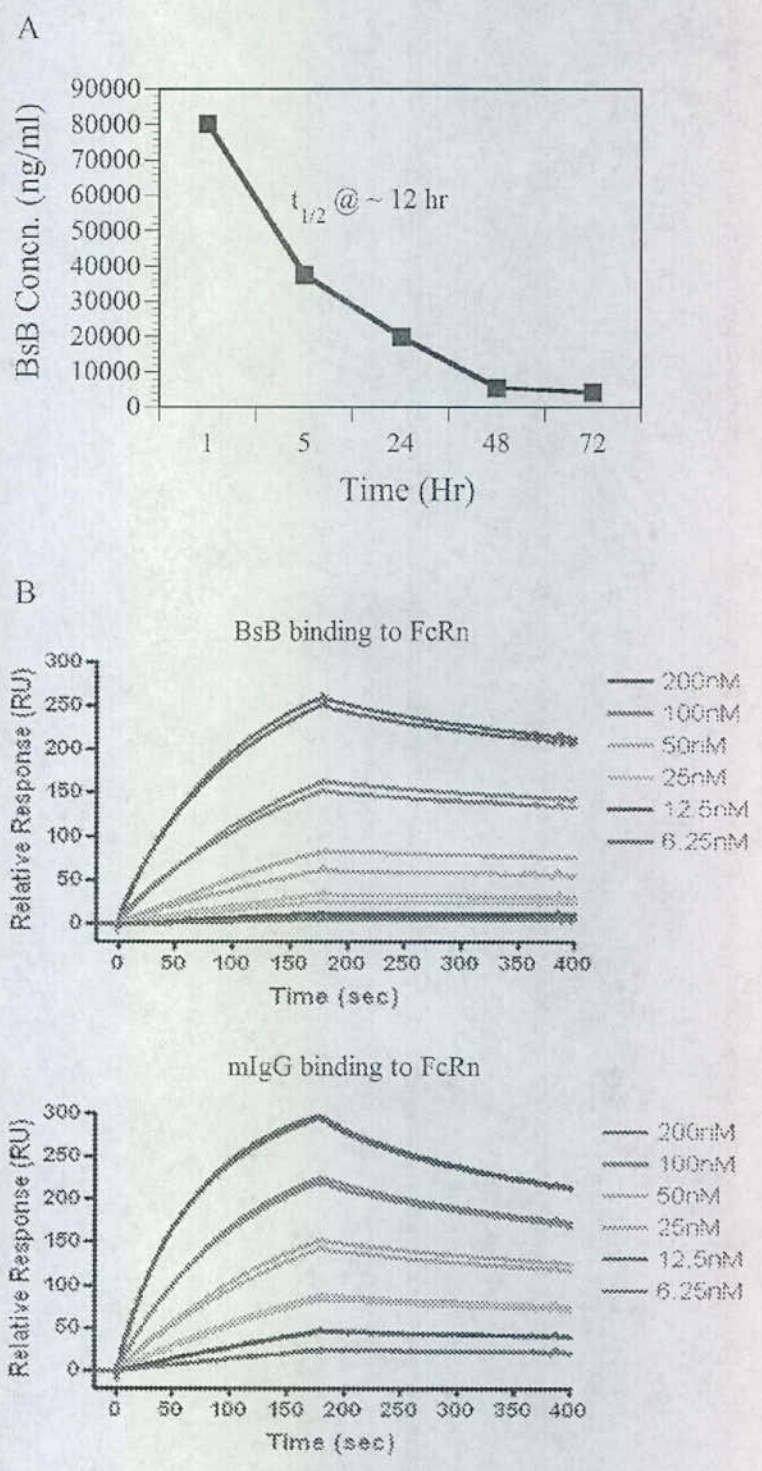


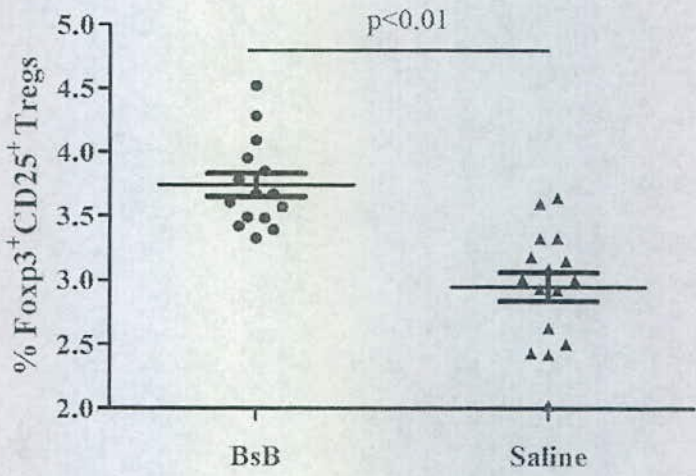
Figure 8

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

Sugars/BsB	Fuc	GlcNAc	Gal	Man	Sialic acid	Sialic acid/Gal ratio
Mol/Mol	8.0 ± 0.6	37.1 ± 2.2	28.5 ± 1.1	36.8±2.6	19.3 ± 0.7	0.68

Figure 9

A



B

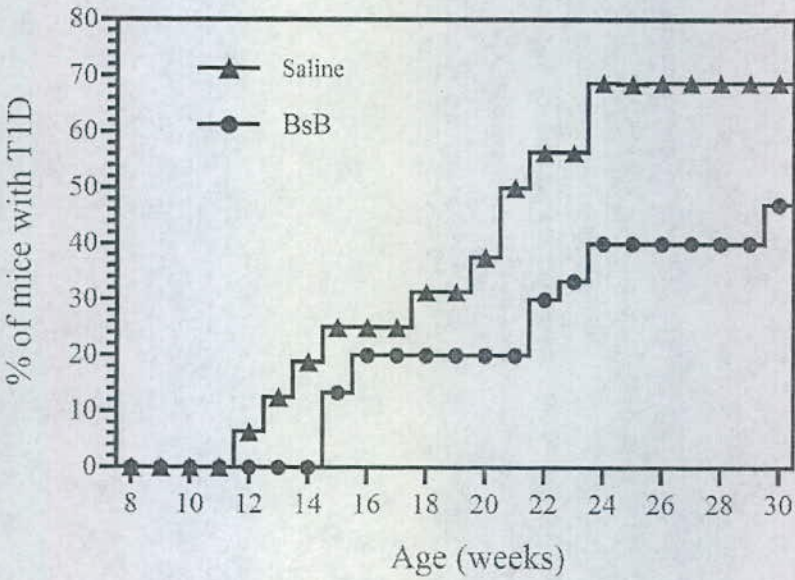


Figure 10

191

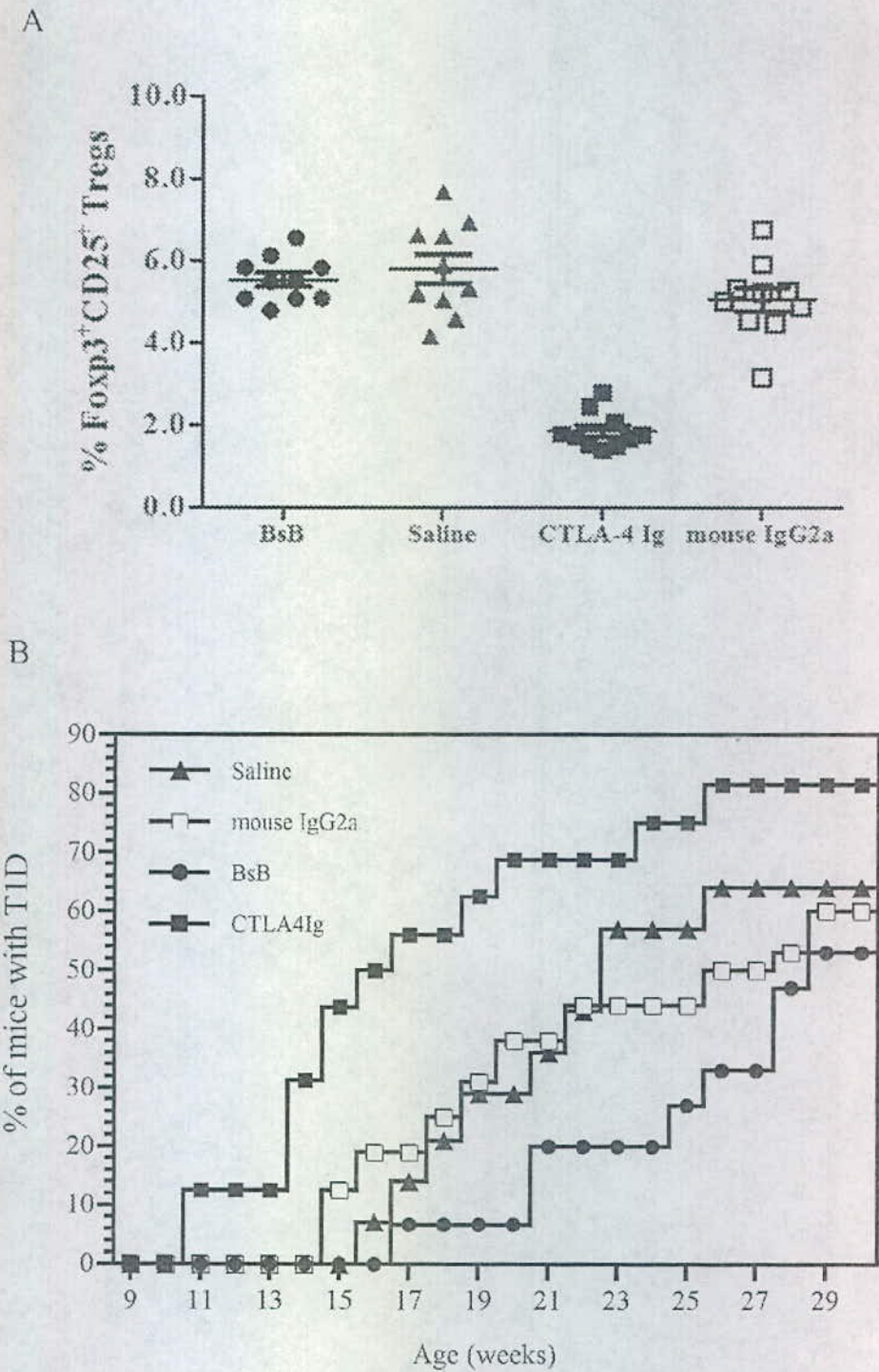


Figure 11

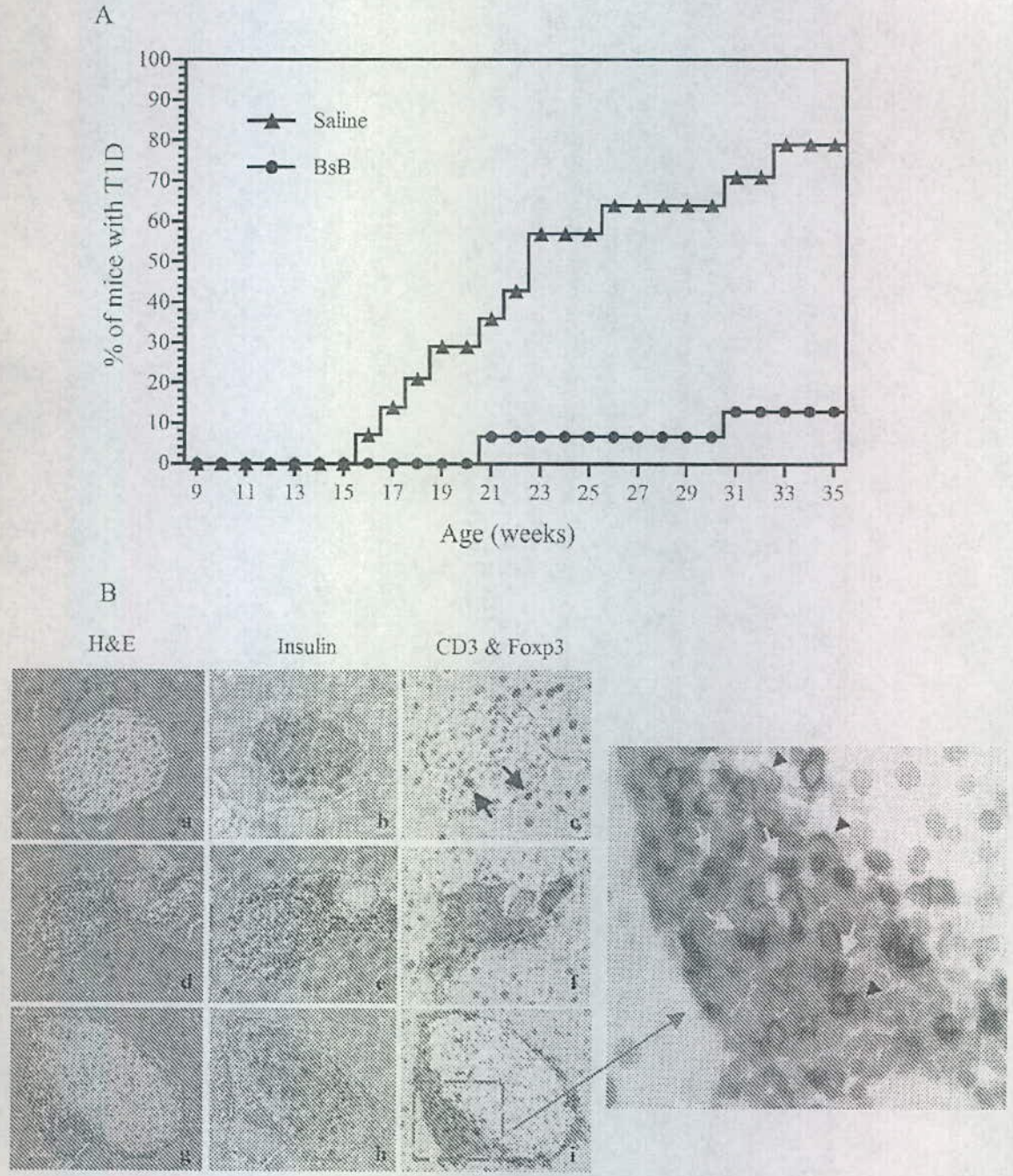


Figure 12

CASTELLANOS & CO LTDA
ABOGADOS
Calle 94 A No. 7 A-09
Bogotá, D.C. - COLOMBIA

193

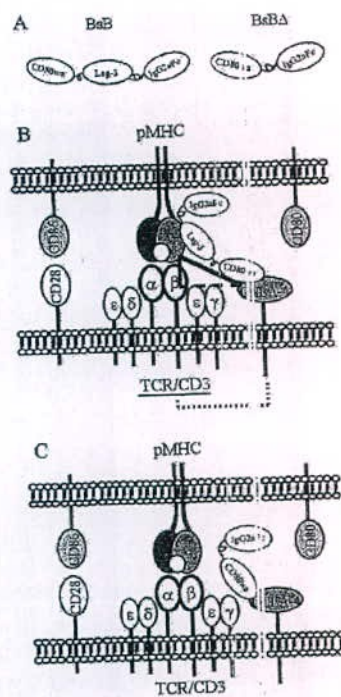


Figure 1

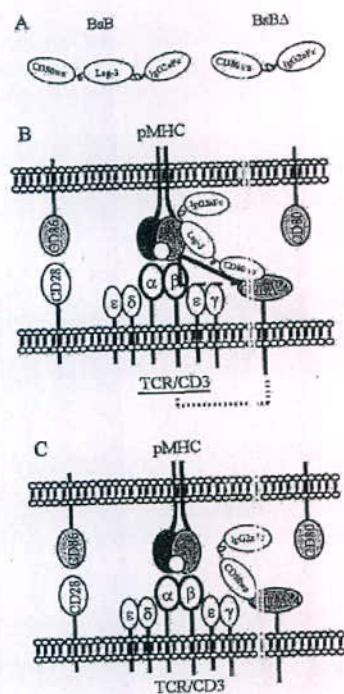


Figure 1

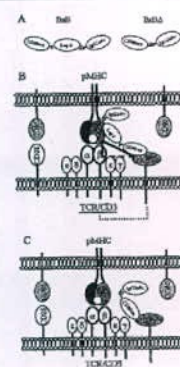


Figure 1



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION _____ PCT X MODELO DE UTILIDAD _____ DISEÑO INDUSTRIAL _____

(21) No. de solicitud _____ (22) Fecha de solicitud _____
 (51) Clasificación internacional _____

(71) Solicitante (s) **GENZYME CORPORATION**

(72) Inventor (es) **ZHU, Yunxiang; KARMAN, Jozsef; WEI, Ronnie; JIANG, Canwen; CHEN, Seng**

(74) Apoderado **DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
		61/503,282		30/06/2011		US

(85) Fecha inicio fase nacional: (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 29/06/2012 No. de solicitud: PCT/US2012/045017	(87) Publicación internacional Fecha: 03/01/2013 N° publicación: WO/2013/003761 A1
--	--

(54) Título: **INHIBIDORES DE LA ACTIVACION DE LAS CELULAS T**

	EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN ___ Patente de Invención ___ Patente modelo de utilidad <u>X</u> PCT
---	---

(21) No. De solicitud	(51) int. Cl:
(22) Fecha de solicitud	(71) Solicitante (s) GENZYME CORPORATION
(30) Prioridad	(72) Interventor (es) ZHU, Yunxiang KARMAN, Jozsef WEI, Ronnie JIANG, Canwen CHEN, Seng
(31) No. Prioridad 61/503.282	(74) Apoderado (s) DRA. MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
(32) Fecha 30/06/2011	
(33) País US	
(54) Título INHIBIDORES DE LA ACTIVACION DE LAS CELULAS T	
Las casillas identificadas con 85, 86 y 87 sólo aplican para PCT	
(85) Fecha límite inicio Fase Nacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud 29/06/2012 No. de solicitud PCT/US2012/045017	(87) Publicación internacional Fecha 03/01/2013 No. Publicación WO 2013/003761 A1

Resumen reivindicación (es):

1. Uso de un agente biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la inducción de tolerancia de una célula T por la puesta en contacto de dicha célula T con una célula presentadora de antígeno que está presentando un péptido derivado de dicho antígeno formando un complejo con una molécula MHC y dicho agente biológico biespecífico.
2. Uso de un agente biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad autoinmune y rechazo de trasplante.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad autoinmune es diabetes tipo 1 (T1D).
4. Uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el ligando específico para CTLA-4 se selecciona de un anticuerpo específico para CTLA-4, y CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2).
5. Uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el ligando específico para el complejo pMHC se selecciona de un anticuerpo anti-MHC y LAG-3.
6. Uso según cualquier reivindicación anterior, en el que el ligando específico para CTLA-4 y el ligando específico para el complejo pMHC están espaciados entre sí por un conector.
7. Uso según la reivindicación 6, en el que el conector es uno o más de una secuencia de poliaminoácido y un dominio Fc de anticuerpo.
8. Uso según la reivindicación 7, en el que la secuencia de poliaminoácido es G9 (Gly-9).
9. Uso según la reivindicación 4, en el que el ligando específico para CTLA-4 es CD80.
10. Uso según la reivindicación 9, en el que CD80 está mutado para incrementar la especificidad para CTLA-4.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que CD80 es CD80 humano que comprende al menos una de las mutaciones W84A, K71G, K71V, S109G, R123S, R123D, G124L, S190A, S201A, R63A, M81A, N97A y E196A.
12. Uso según la reivindicación 11, en el que CD80 comprende la mutación W84A o E196A de CD80 humano.
13. Uso según la reivindicación 5, en el que el ligando específico para el complejo MHC es LAG-3.
14. Uso según la reivindicación 13, en el que LAG-3 está mutado para incrementar la especificidad para pMHCII.
15. Uso según la reivindicación 14, en el que LAG-3 es LAG-3 humano que comprende al menos una de las mutaciones R73E, R75A, R75E y R76E.
16. Uso según la reivindicación 15, en el que LAG-3 comprende la mutación R75A o R75E.
17. Un agente biológico biespecífico que comprende un ligando específico para CTLA-4 y un ligando específico para un complejo pMHC.

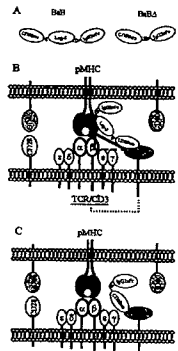


Figure 1

PATENTE DE INVENCION _____ **MODELO DE UTILIDAD** _____ **Art 33 Decisión 486/00**

Indicación que se solicita 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 (De ser el caso formato de descuento)

Completa _____ Incompleta _____

PATENTE DE INVENCION PCT X **MODELO DE UTILIDAD PCT** _____ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

X Indicación que se solicita una PCT
X Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
X Dibujos de ser estos pertinentes
X Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa X Incompleta _____

DISEÑO INDUSTRIAL _____ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

Indicación que se solicita 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 _____ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

Indicación que se solicita un esquema de trazado
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
Representación gráfica de un esquema de trazado
Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa _____ Incompleta _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-301377- -00000-0000
Fecha: 2013-12-27 15:26:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 195