

ANTICUERPOS ANTI-CTLA-4 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud invoca el beneficio de las Solicitudes Provisionales de Patente de los EE.UU. N°: 62/168.391, presentada el 29 de mayo, 2015; 62/182.363, presentada el 19 de junio, 2015; 62/190.653, presentada el 9 de julio, 2015; 62/257.202, presentada el 18 de noviembre, 2015; 62/280.263, presentada el 19 de enero, 2016; 62/292.500, presentada el 8 de febrero, 2016; 62/294.558, presentada el 12 de febrero, 2016; 62/323.226, presentada el 15 de abril, 2016, cada una de las cuales se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

1. CAMPO

[0001] La presente divulgación se relaciona con anticuerpos que se unen específicamente al CTLA-4 humano y con métodos de uso de los mismos.

2. ANTECEDENTES

[0002] Los linfocitos T son fundamentales para la respuesta inmune adaptativa al antígeno. Se necesitan por lo menos dos señales para la activación completa de células T sin exposición previa [naive] (Bretscher 1999, *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 185-90). Una primera señal, específica del antígeno, es provista por la interacción del receptor de células T (TCR) con el complejo de MHC/péptido sobre una célula presentadora de antígenos (APC). Una segunda señal, coestimulante, es provista por las interacciones entre los receptores sobre la célula T y sus ligandos sobre una célula presentadora de antígenos (APC). El acoplamiento de ambas interacciones de TCR/MHC y

coestimulante conduce a la activación de células T por numerosas vías intracelulares, que incluyen las vías de calcio-calcineurina y proteína quinasa activada por el mitógeno RAS, y la subsiguiente activación de factores de transcripción para numerosos compuestos efectores, que incluyen citoquinas tal como la IL-2. Estos eventos conducen a la proliferación de células T, la generación de una agrupación de células T auxiliares $CD4^+$ (T^H) y la expansión de células T citotóxicas $CD8^+$ activadas. La coestimulación no sólo es crítica para una activación completa de células T, sino que su ausencia durante el acoplamiento de TCR/MHC da como resultado anergia y/o apoptosis.

[0003] Hay múltiples vías coestimulantes positivas y negativas involucradas en la regulación de las células T, pero sin embargo, las más críticas son entre el CD28 sobre las células T y B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) sobre las APC. El CD28 promueve la diferenciación de las células T en células con el fenotipo TH1 y mejora la producción de anticuerpos por las células B y la activación de células T. B7-1 y B7-2, que se expresan sobre las APC, tales como células dendríticas (DC) y células B, tienen funciones superpuestas pero distintas. B7-2 se expresa de manera constitutiva y es sobrerregulado rápidamente sobre las APC de manera coincidente con el acoplamiento TCR/MHC (señal 1). La expresión de B7-1 es muy baja sobre la célula en reposo, pero típicamente es inducida después de una estimulación prolongada de las células T. Estas diferencias sugieren que si bien B7-2 puede ser importante en la inicialización de la activación de las células T, B7-1 puede cumplir un rol más importante en la perpetuación de la respuesta inmune.

[0004] Después de la activación de las células T, hay una sobrerregulación del antígeno 4 del receptor regulador negativo de linfocitos T

citotóxicos (CTLA-4) sobre las células T (Alegre et al., 2001, *Nat Rev Immunol* 1: 220-8). El CTLA-4 es estructuralmente homólogo de CD28 pero se une más estrechamente a ambos ligandos B7-1 y B7-2. El CTLA-4 inhibe la respuesta inmune de varias maneras: compite con CD28 por los ligandos B7 y por lo tanto bloquea la coestimulación; envía señales negativas para inhibir la activación de las células T; y puede capturar CD80 y CD86 de células opuestas mediante trans-endocitosis, dando como resultado una costimulación deteriorada por CD28 (Krummel y Allison, 1995, *J Exp Med* 182: 459-465; Walunas et al., 1994, *Immunity* 1: 405-413; Qureshi et al., 2011, *Science* 332: 600-603).

[0005] Dado el rol crítico de la vía coestimulante B7 en la promoción y el mantenimiento de una respuesta inmune, los agentes terapéuticos diseñados para antagonizar esta vía son promisorios para el tratamiento de enfermedades y trastornos autoinmunes.

3. SÍNTESIS

[0006] La presente divulgación provee anticuerpos que se unen específicamente al CTLA-4 humano y antagonizan la función del CTLA-4, por ejemplo, una supresión inmune mediado por CTLA-4. También se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos, ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos, vectores de expresión y células huésped para elaborar estos anticuerpos, y métodos de tratamiento de un sujeto usando estos anticuerpos. Los anticuerpos divulgados en la presente son de particular utilidad para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno (por ejemplo, un antígeno tumoral) y/o para disminuir la supresión inmune mediada por Treg, y por ende para el tratamiento de cáncer en un sujeto.

[0007] Por lo tanto, en un aspecto la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

- (a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos SYX₁MX₂ (SEQ ID N°: 22), en donde X₁ es S o A; y X₂ es N o S;
- (b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos SSSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID N°: 2);
- (c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos VGLMGPFXI (SEQ ID N°: 23), en donde X es D o N;
- (d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID N°: 24), en donde X₁ es S o G; X₂ es R, S o T; y X₃ es G o A;
- (e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID N°: 25), en donde X₁ es G o A; X₂ es A o T; y X₃ es T, S, R o N; y
- (f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYGX₁SPX₂T (SEQ ID N°: 26), en donde X₁ es S o T; y X₂ es W o F.

[0008] En determinadas formas de realización, la CDRH1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 1 y 27. En determinadas formas de realización, la CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 3 y 28. En determinadas formas de realización, la CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que

consiste en las SEQ ID N°: 4, 29 y 30. En determinadas formas de realización, la CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 5 y 31-35. En determinadas formas de realización, la CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 6, 36 y 37. En determinadas formas de realización, las CDRH1, CDRH2 y CDRH3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente, ilustradas en las SEQ ID N°: 1, 2 y 3; 27, 2 y 3; o 27, 2 y 28. En determinadas formas de realización, las CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente, ilustradas en las SEQ ID N°: 4, 5 y 6; 29, 32 y 36; 29, 33 y 37; 30, 31 y 6; 29, 34 y 6; o 29, 35 y 37. En determinadas formas de realización, las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos ilustradas en las SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

[0009] En otro aspecto, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

- (a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos SYX₁MX₂ (SEQ ID N°: 22), en donde X₁ es S o A; y X₂ es N o S;
- (b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos SISSSSSYIYYADSVK (SEQ ID N°: 2);
- (c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos VGLMGPFXI

(SEQ ID N°: 23), en donde X es D o N;

(d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID N°: 24), en donde X₁ es S o G; X₂ es R, S o T; y X₃ es G o A;

(e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID N°: 25), en donde X₁ es G o A; X₂ es A o T; y X₃ es T, S, R o N; y

(f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYGX₁SPX₂T (SEQ ID N°: 26), en donde X₁ es S o T; y X₂ es W o F.

[0010] En determinadas formas de realización, la CDRH1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 1 y 27. En determinadas formas de realización, la CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 3 y 28. En determinadas formas de realización, la CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 4, 29 y 30. En determinadas formas de realización, la CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 5 y 31-35. En determinadas formas de realización, la CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 6, 36 y 37. En determinadas formas de realización, las CDRH1, CDRH2 y CDRH3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente, ilustradas en las SEQ ID N°: 1, 2 y 3; 27, 2 y 3; o 27, 2 y 28. En determinadas formas de realización, las CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente, ilustradas en las SEQ ID N°: 4, 5 y 6; 29, 32 y 36; 29, 33 y 37; 30, 31 y 6; 29, 34 y 6; o 29, 35 y

37.

[0011] En otro aspecto, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos ilustradas en las SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

[0012] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 72. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95% o un 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 7 y 38-42. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 7 y 38-42. En determinadas formas de realización, la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 12. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de

aminoácidos de la SEQ ID N°: 93. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 94. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 76. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 97. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de línea germinal de la IGHV3-21 humana (por ejemplo, IGHV3-21*01, por ejemplo, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 9).

[0013] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 73. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95% o un 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 8 y 43-47. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 8 y 43-47. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la

SEQ ID N°: 8. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de línea germinal de la IGKV3-20 humana (por ejemplo, IGKV3-20*01, por ejemplo, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 10) o una secuencia de línea germinal de la IGKV3-11 humana (por ejemplo, IGKV3-11*01, por ejemplo, que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 11).

[0014] En otro aspecto, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 7 y 38-42.

[0015] En otro aspecto, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 8 y 43-47.

[0016] En otro aspecto, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena liviana, en donde la región variable de la cadena pesada y la región

variable de la cadena liviana, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos ilustradas en las SEQ ID N°: 7 y 8; 7 y 44; 7 y 45; 38 y 8; 38 y 45; 39 y 43; 39 y 45; 39 y 46; 39 y 47; 40 y 43; 40 y 8; 40 y 44; 40 y 45; 41 y 8; 41 y 44; 41 y 45; 41 y 47; 42 y 43; o 42 y 45. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7; y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 12; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 93; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 94; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 76; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos

de la SEQ ID N°: 97; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13.

[0017] En otro aspecto, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de línea germinal de la IGHV3-21 humana; y una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de línea germinal de la IGKV3-20 humana o una secuencia de línea germinal de la IGKV3-11 humana.

[0018] En otro aspecto, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que compite de manera cruzada por la unión a la proteína CTLA-4 humana con un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de las cadenas pesada y liviana ilustradas en las SEQ ID N°: 7 y 8, respectivamente.

[0019] En otro aspecto, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une al mismo epítopo sobre la proteína CTLA-4 humana que un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de las cadenas pesada y liviana ilustradas en las SEQ ID N°: 7 y 8, respectivamente.

[0020] En otro aspecto, la presente divulgación provee un anticuerpo que se une a un epítopo del CTLA-4 humano. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo del CTLA-4 humano que comprende, que consiste esencialmente o que consiste en los residuos 140-141 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo del CTLA-4 humano que consiste en los residuos 140-141

de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a por lo menos un residuo del CTLA-4 humano seleccionado del grupo que consiste en los residuos 140 y 141 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo del CTLA-4 humano que comprende, que consiste esencialmente o que consiste en los residuos 140-143 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo del CTLA-4 humano que consiste en los residuos 140-143 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo del CTLA-4 humano que comprende, que consiste esencialmente o que consiste en los residuos 135-143 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo del CTLA-4 humano que consiste en los residuos 135-143 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo del CTLA-4 humano que comprende, que consiste esencialmente o que consiste en los residuos 140-149 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo del CTLA-4 humano que consiste en los residuos 140-149 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo del CTLA-4 humano que comprende, que consiste esencialmente o que consiste en los residuos 135-149 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo del CTLA-4 humano que consiste en los residuos 135-149 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo del CTLA-4 humano que comprende, que consiste esencialmente o que consiste en los residuos 80-82 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se une a un epítopo

del CTLA-4 humano que consiste en los residuos 80-82 de la SEQ ID N°: 77.

[0021] En otro aspecto, la presente divulgación provee un anticuerpo en el cual, luego de la unión del anticuerpo a la proteína CTLA-4 humana seguido por adición de deuterio, se reduce sustancialmente el intercambio de hidrógeno en la proteína CTLA-4 humana por deuterio en una región que comprende los residuos 140-141 de la SEQ ID N°: 77 con relación al intercambio de hidrógeno en la proteína CTLA-4 humana con deuterio en la misma región pero en la ausencia del anticuerpo, determinado mediante intercambio de hidrógeno/deuterio. En determinadas formas de realización, la región del CTLA-4 humano comprende los residuos 140-143 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, la región del CTLA-4 humano comprende los residuos 135-143 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, la región del CTLA-4 humano comprende los residuos 140-149 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, la región del CTLA-4 humano comprende los residuos 135-149 de la SEQ ID N°: 77. En determinadas formas de realización, luego de la unión del anticuerpo a la proteína CTLA-4 humana seguido por adición de deuterio, el intercambio de hidrógeno en la proteína CTLA-4 humana con deuterio en una región que comprende los residuos 80-82 de la SEQ ID N°: 77 está sustancialmente reducida con relación al intercambio de hidrógeno en la proteína CTLA-4 humana con deuterio en la misma región pero en la ausencia del anticuerpo, determinado mediante intercambio de hidrógeno/deuterio.

[0022] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂ humanas. En determinadas formas

de realización, la región constante de la cadena pesada es la IgG₁. En determinadas formas de realización, la región constante de la cadena pesada es la IgG₂. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena liviana seleccionada del grupo que consiste en las IgGκ e IgGλ humanas

[0023] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG humana que es una variante de una región constante de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje, en donde la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana se une a receptores Fc gamma humanos seleccionados del grupo que consiste en FcγRIIB y FcγRIIA con una mayor afinidad que la región constante de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje se une a los receptores Fc gamma humanos. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG humana que es una variante de una región constante de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje, en donde la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana se une al FcγRIIB humano con mayor afinidad que la región constante de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje se une al FcγRIIB humano. En determinadas formas de realización, la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana es una región constante de la cadena pesada de una variante de la IgG₁ humana, una variante de la IgG₂ humana o una variante de la IgG₄ humana. En determinadas formas de realización, la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana comprende una o más de las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración EU:

G236D, P238D, S239D, S267E, L328F y L328E. En determinadas formas de realización, la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana comprende un conjunto de mutaciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: S267E y L328F; P238D y L328E; P238D y una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en E233D, G237D, H268D, P271G y A330R; P238D, E233D, G237D, H268D, P271G y A330R; G236D y S267E; S239D y S267E; V262E, S267E y L328F; y V264E, S267E y L328F, de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana comprende además una o más mutaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de la IgG por el FcγRIIIA humano, el FcγRIIA humano o el FcγRI humano. En determinadas formas de realización, el FcγRIIB se expresa sobre una célula seleccionada del grupo que consiste en macrófagos, monocitos, células B, células dendríticas, células endoteliales y células T activadas.

[0024] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG humana que es una variante de una región constante de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje, en donde la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana se une a receptores Fc gamma humanos con mayor afinidad que la región constante de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje se une a los receptores Fc gamma humanos. En determinadas formas de realización, el receptor Fc gamma humano comprende motivo de activación basado en tirosina del inmunoreceptor (ITAM). En determinadas formas de realización, el receptor Fc gamma humano se selecciona del grupo que

consiste en FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRI. En determinadas formas de realización, el receptor Fc gamma humano es FcγRIIIA. En determinadas formas de realización, la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana comprende una o más de las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración EU: G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305I, A330L, I332E, E333A, K334A, A339T y P396L. En determinadas formas de realización, la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana comprende un conjunto de mutaciones de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en: S239D; T256A; K290A; S298A; I332E; E333A; K334A; A339T; S239D y I332E; S239D, A330L y I332E; S298A, E333A y K334A; G236A, S239D y I332E; y F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L, de acuerdo con el sistema de numeración EU. En determinadas formas de realización, la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana comprende las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración EU: S239D, A330L e I332E. En determinadas formas de realización, la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana comprende las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración EU: S239D y I332E. En determinadas formas de realización, la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana es una variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG₁ humana que comprende las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración EU: S239D y I332E. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región Fc afucosilada. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se formula para una administración intratumoral. En

determinadas formas de realización, el anticuerpo o la composición farmacéutica se administra por vía intratumoral. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se formula para su administración en un nódulo linfático de drenaje tumoral. En determinadas formas de realización, el anticuerpo o la composición farmacéutica se administra en un nódulo linfático de drenaje tumoral. En determinadas formas de realización, el anticuerpo se formula para una administración subcutánea. En determinadas formas de realización, el anticuerpo o la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea.

[0025] En determinadas formas de realización, el receptor Fc gamma humano es el FcγRIIc. En determinadas formas de realización, el receptor Fc gamma humano se expresa sobre una célula seleccionada del grupo que consiste en macrófagos, monocitos, células B y células dendríticas. En determinadas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En determinadas formas de realización, el anticuerpo es un antagonista del CTLA-4. En determinadas formas de realización, el anticuerpo inhibe la unión de la proteína CTLA-4 humana al CD80 humano o al CD86 humano.

[0026] En determinadas formas de realización, el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico, un agente citostático, una toxina, un radionúclido o una marca detectable.

[0027] En una forma de realización, la presente invención se relaciona con un anticuerpo de la presente invención para su uso como un medicamento.

[0028] En una forma de realización, la presente invención se relaciona con el uso de un anticuerpo de la presente invención en la preparación de composiciones farmacéuticas o medicamentos para inmunoterapias.

Preferiblemente, las inmunoterapias son para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto, opcionalmente para el tratamiento de cáncer o para el tratamiento o la prevención de enfermedades infecciosas.

[0029] En una forma de realización, la presente invención se relaciona con un anticuerpo de la presente invención para su uso como un elemento de diagnóstico.

[0030] En una forma de realización, la presente invención se relaciona con el uso de un anticuerpo de la presente invención para la detección *in vitro* del CTLA-4 humano en una muestra biológica.

[0031] En otro aspecto, la presente divulgación provee una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 divulgado en la presente y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0032] En otro aspecto, la presente divulgación provee un polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada y/o liviana de un anticuerpo divulgado en la presente. En otro aspecto, la presente divulgación provee un vector que comprende al polinucleótido. En otro aspecto, la presente divulgación provee una célula huésped recombinante que comprende al polinucleótido o al vector. En otro aspecto, la presente divulgación provee un método de producción de un anticuerpo que se une al CTLA-4 humano, donde dicho método comprende cultivar la célula huésped de modo tal que se expresará el polinucleótido y se producirá el anticuerpo.

[0033] En otro aspecto, la presente divulgación provee un método para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto, donde dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad

eficaz de un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica divulgada en la presente. En otro aspecto, la presente divulgación provee un método de tratamiento de cáncer en un sujeto, donde dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica divulgada en la presente. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica divulgada en la presente se administra por vía subcutánea o intravenosa. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se administra por vía intravenosa a razón de 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg o 10 mg/kg, opcionalmente a un intervalo de una vez cada tres semanas. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se administra por vía intratumoral. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se administra por vía intratumoral a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg, opcionalmente a un intervalo de una vez cada tres semanas. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se administra por vía intratumoral a razón de 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg o 0,3 mg/kg, opcionalmente a un intervalo de una vez cada tres semanas. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se administra por vía intratumoral a una dosis que es hasta 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o 200 veces menor que una dosis suministrada

mediante una administración sistémica. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se administra por vía intratumoral a una dosis que es hasta 10 veces menor que una dosis suministrada mediante una administración sistémica. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se administra por vía intratumoral a una dosis que es hasta 100 veces menor que una dosis suministrada mediante una administración sistémica. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se administra por vía intratumoral y el método comprende además administrar un agente terapéutico adicional al sujeto. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional se administra por vía sistémica. En determinadas formas de realización, el sujeto tiene un tumor sólido y el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-PD-1. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab o nivolumab. En determinadas formas de realización, el sujeto tiene carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-EGFR. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-EGFR es cetuximab. En determinadas formas de realización, el sujeto tiene cáncer de mama HER2+ y el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-HER2. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-HER2 es trastuzumab. En determinadas formas de realización, estos métodos comprenden además administrar un agente quimioterapéutico al sujeto. En determinadas formas de realización, el agente quimioterapéutico se administra por vía sistémica. En determinadas formas de

realización, el agente quimioterapéutico es gemcitabine. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se administra por vía intratumoral y el sujeto tiene un tumor sólido avanzado o metastásico. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se administra por vía intratumoral y el sujeto tiene cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello recidivante/refractario). En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se administra por vía intratumoral y el sujeto tiene cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama HER2+ recidivante/refractario). En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se suministra en un nódulo linfático de drenaje tumoral. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se suministra mediante una administración localizada (por ejemplo, una administración subcutánea). En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se suministra mediante una administración localizada (por ejemplo, una administración subcutánea) a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se suministra mediante una administración localizada (por ejemplo, una administración subcutánea) a una dosis que es hasta 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, o 200 veces menor que

una dosis suministrada mediante una administración sistémica. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se suministra mediante una administración localizada (por ejemplo, una administración subcutánea) a una dosis que es hasta 10 veces menor que una dosis suministrada mediante una administración sistémica. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se suministra mediante una administración localizada (por ejemplo, una administración subcutánea) a una dosis que es hasta 100 veces menor que una dosis suministrada mediante una administración sistémica. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se suministra mediante una administración localizada (por ejemplo, una administración subcutánea) y el método comprende además administrar un agente terapéutico adicional al sujeto. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es una vacuna. En determinadas formas de realización, la vacuna comprende un complejo de proteína-péptido de shock de calor (HSPPC) que comprende una proteína de shock de calor que forma complejo con un péptido antigénico. En una forma de realización, la proteína del shock de calor es la proteína gp96 y está complejada con un péptido antigénico asociado a tumores, en donde el HSPPC deriva de un tumor obtenido de un sujeto. En determinadas formas de realización, la proteína de shock de calor se selecciona del grupo que consiste en hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, gp96, calreticulina, un mutante de las mismas y combinaciones de dos o más de las mismas. En determinadas formas de realización, la proteína de shock de calor es hsc70. En

determinadas formas de realización, la proteína de shock de calor es hsp70. En determinadas formas de realización, el péptido antigénico es sintético. En determinadas formas de realización, el sujeto tiene cáncer. En determinadas formas de realización, el sujeto tiene una enfermedad infecciosa. En determinadas formas de realización, estos métodos comprenden además administrar un agente terapéutico adicional al sujeto. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente de direccionamiento a un punto de control. En determinadas formas de realización, el agente de direccionamiento a un punto de control se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1 antagonista, un anticuerpo anti-PD-L1 antagonista, un anticuerpo anti-CD27 antagonista, un anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista, un anticuerpo anti-TIM-3 antagonista, un anticuerpo anti-LAG-3 antagonista, un anticuerpo anti-CEACAM1 antagonista, un anticuerpo anti-GITR agonista, un anticuerpo anti-OX40 agonista y un anticuerpo anti-CD137 agonista, un anticuerpo anti-DR3 agonista, un anticuerpo anti-TNFSF14 agonista y un anticuerpo anti-CD27 agonista. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es una radioterapia. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO). Los inhibidores de la IDO adecuado incluyen, en un sentido no taxativo, epacadostat, F001287, indoximod y NLG919. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es una vacuna. En determinadas formas de realización, la vacuna comprende un complejo de proteína-péptido de shock de calor (HSPPC) que comprende una proteína de shock de calor que forma complejo con un péptido antigénico. En una forma de realización, la

proteína del shock de calor es la proteína gp96 y está complejada con un péptido antigénico asociado a tumores, en donde el HSPPC deriva de un tumor obtenido de un sujeto.

[0034] En una forma de realización, la presente invención se relaciona con un anticuerpo de la presente invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención y/o una célula huésped recombinante de la invención, para su uso como un medicamento.

[0035] En una forma de realización, la presente invención se relaciona con un anticuerpo de la presente invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención y/o una célula huésped recombinante de la invención, para su uso como un medicamento.

[0036] En una forma de realización, la presente invención se relaciona con el uso de un anticuerpo de la presente invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención y/o una célula huésped recombinante de la invención, para la detección *in vitro* del CTLA-4 humano en una muestra biológica.

[0037] En un aspecto, en la presente se provee una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 divulgado en la presente y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso como un medicamento.

[0038] En un aspecto, en la presente se provee una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 divulgado en la presente y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso como un elemento de diagnóstico.

[0039] En un aspecto, en la presente se provee una composición

farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 divulgado en la presente, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención y/o una célula huésped recombinante de la invención, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición farmacéutica es para usar como un medicamento y/o un elemento de diagnóstico.

[0040] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención, para su uso en un método para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno.

[0041] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención, para su uso en un método para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto.

[0042] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención, para su uso en un método para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención.

[0043] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo, un ácido nucleico, un vector, una célula huésped y/o una composición farmacéutica de la presente invención, para su uso en un método

para el tratamiento de cáncer.

[0044] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo, un ácido nucleico, un vector, una célula huésped y/o una composición farmacéutica de la presente invención, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un sujeto.

[0045] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la invención.

[0046] En un aspecto, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional, preferiblemente un anticuerpo anti-PD-1, para su uso como un medicamento.

[0047] En un aspecto, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional, preferiblemente un anticuerpo anti-PD-1, para su uso en un método de tratamiento de cáncer. En una forma de realización preferida, el cáncer es un tumor sólido. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía intratumoral al

sujeto, preferiblemente se administra por vía intratumoral al sujeto a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg, opcionalmente a un intervalo de una vez cada tres semanas.

[0048] En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica, un conjunto o un conjunto de elementos que comprende (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional, preferiblemente un anticuerpo anti-PD-1.

[0049] En un aspecto, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b) un anticuerpo anti-EGFR, y opcionalmente (c) un agente quimioterapéutico, para su uso como un medicamento.

[0050] En un aspecto, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b) un anticuerpo anti-EGFR, y opcionalmente (c) un agente quimioterapéutico, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer. En una forma de realización preferida, el cáncer es un carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía intratumoral al sujeto, preferiblemente se administra por vía intratumoral al sujeto a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg, opcionalmente a un intervalo de una vez cada tres semanas.

[0051] En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica, un conjunto o un conjunto de elementos que comprende (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b) un anticuerpo anti-EGFR, y opcionalmente (c) un agente quimioterapéutico.

[0052] En un aspecto, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b) un anticuerpo anti-HER2, y opcionalmente (c) un agente quimioterapéutico, para su uso como un medicamento.

[0053] En un aspecto, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b) un anticuerpo anti-HER2, y opcionalmente (c) un agente quimioterapéutico, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer de mama HER2+. En otra forma de realización preferida, el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía intratumoral al sujeto, preferiblemente se administra por vía intratumoral al sujeto a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg, opcionalmente a un intervalo de una vez cada tres semanas.

[0054] En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica, un conjunto o un conjunto de elementos que comprende (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b)

un anticuerpo anti-HER2, y opcionalmente (c) un agente quimioterapéutico.

[0055] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer, en donde el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía intratumoral al sujeto, preferiblemente se administra por vía intratumoral al sujeto a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg, opcionalmente a un intervalo de una vez cada tres semanas.

[0056] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer, en donde el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía subcutánea o intravenosa al sujeto, preferiblemente se administra por vía intravenosa al sujeto a razón de 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg o 10 mg/kg, opcionalmente a un intervalo de una vez cada tres semanas.

[0057] En un aspecto, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional, para su uso como un medicamento. En una forma de realización preferida, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente de direccionamiento a un punto de control o un

inhibidor de la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) o una vacuna.

[0058] En un aspecto, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo, un polinucleótido o un vector, una célula huésped y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer. En una forma de realización preferida, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente de direccionamiento a un punto de control o un inhibidor de la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) o una vacuna.

[0059] En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica, un conjunto de elementos o un conjunto de elementos de partes que comprende (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional. En una forma de realización preferida, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente de direccionamiento a un punto de control o un inhibidor de la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) o una vacuna.

[0060] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer y/o para su uso en un método para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno, en donde el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención se suministra en un nódulo linfático de drenaje tumoral.

[0061] En un aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de

un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención en un método para el tratamiento de cáncer, y/o en un método para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto, en donde el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención se suministra en un nódulo linfático de drenaje tumoral.

[0062] En un aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención, en la preparación de medicamentos para una inmunoterapia, por ejemplo, para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto, para tratar cáncer o para tratar o prevenir enfermedades infecciosas.

[0063] En un aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención, en la preparación de medicamentos para inmunoterapias, por ejemplo, para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto, para tratar cáncer o para tratar o prevenir enfermedades infecciosas, en donde el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención se suministra en un nódulo linfático de drenaje tumoral.

[0064] En un aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b)

un anticuerpo anti-HER2, y opcionalmente (c) un agente quimioterapéutico, en la preparación de un medicamento para inmunoterapias, por ejemplo, para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto, para tratar cáncer o para tratar o prevenir enfermedades infecciosas.

[0065] En un aspecto, la presente invención se relaciona con el uso de (a) un anticuerpo, un polinucleótido, un vector, una célula huésped recombinante y/o una composición farmacéutica de la presente invención y (b) un anticuerpo anti-HER2, y opcionalmente (c) un agente quimioterapéutico, en la preparación de un medicamento para inmunoterapias, por ejemplo, para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto, para tratar cáncer o para tratar o prevenir enfermedades infecciosas, en donde el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención se suministra en un nódulo linfático de drenaje tumoral.

4. DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0066] La Figura 1A es una tabla donde se muestran las afinidades de unión (K_D) del anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884 y un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₁ de referencia a un CTLA-4 dimérico y monomérico recombinante humano, de cinomolgo, de ratón y de rata medidas mediante resonancia de plasmón superficial. La Figura 1B es un gráfico que muestra la unión de AGEN1884w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₁ de referencia y un control de isotipo de la IgG₁, a células que expresan CTLA-4, medida mediante citometría de flujo. Se calculó y se graficó la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) contra un rango de concentraciones de anticuerpo. En las Figuras 1C y 1D se muestra la selectividad de la unión del AGEN1884 y un

anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₁ de referencia al CTLA-4 recombinante humano (rh) y de cinomolgo (rc), en comparación con miembros de familia relacionados (CD28, ICOS, BTLA y PD-1 recombinantes humanos y PD-1 recombinante de cinomolgo), indicada con relación a un anticuerpo de control de isotipo de la IgG₁. La unión se midió mediante tecnología de ordenamientos en suspensión y la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) a tres concentraciones de anticuerpo diferentes (10, 100 y 1000 ng/ml) y se muestra en la Figura 1C. La Figura 1D es un cuadro de síntesis de la afinidad de unión relativa basado en los datos que se muestran en la Figura 1C.

[0067] En la Figura 2A se muestra la unión del AGEN1884w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de referencia y un anticuerpo de control de isotipo de la IgG₁ a células T CD4⁺ humanas primarias activadas. Brevemente, se estimularon células T CD4⁺ recién aisladas usando anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placas durante cinco días antes del análisis de unión del anticuerpo mediante citometría de flujo. Se calculó la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) para un rango de concentraciones de anticuerpo. En la Figura 2B se muestra la unión intracelular de AGEN1884 y un anticuerpo anti-CTLA-4 de referencia en comparación con un anticuerpo control de isotipo de la IgG₁ para una titulación de concentraciones usando células T CD8⁺ de cinomolgo primarias activadas (anti-CD3 y anti-CD28 con IL-2 recombinante durante tres días). Los datos se generaron mediante citometría de flujo y se muestran como el porcentaje de células T CTLA-4⁺ como una proporción de la población total de células T CD8⁺. En la Figura 2C se muestran los resultados de un análisis por citometría de flujo que evalúa la unión de AGEN1884w y un anticuerpo de control de isotipo de la IgG₁ a células T CD4⁺ humanas, de

cinomolgo, de rata o de ratón estimuladas con fitohemaglutinina.

[0068] La Figura 3A es un esquema del ensayo de bloqueo de ligando usando tecnología de ordenamientos en suspensión. En las Figuras 3B y 3C se muestra el porcentaje de unión de las proteínas recombinantes CD80-Fc (Figura 3B) y CD86-Fc (Figura 3C) a esferas conjugadas con CTLA-4 en la ausencia (100%) o presencia de titulación de dosis de AGEN1884, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia o un anticuerpo de control de isotipo (IgG1). En la Figura 3D se muestra el porcentaje de unión de CD80-Fc y CD86-Fc recombinantes a células T que expresan CTLA-4 (Jurkat) en la presencia de concentraciones crecientes de AGEN1884w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia o un anticuerpo de control de isotipo (IgG1). En la Figura 3E se muestran los resultados de un ensayo en el cual se incubaron células T (Jurkat) que expresan CTLA-4 con una dosis titulada de CD80-Fc o CD86-Fc antes de agregar una concentración fija de AGEN1884w conjugado directamente con un fluoróforo o un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia. Se calculó y se graficó la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) contra un rango de concentraciones de CD80-Fc o CD86-Fc.

[0069] La Figura 4A representa la actividad funcional de anticuerpos anti-CTLA-4 sobre cultivos de PBMC humanas primarias luego de estimulación con la enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA). Específicamente, en la Figura 4A se muestra el cambio en la producción de IL-2 como respuesta a la dosis de AGEN1884w y un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia, en comparación con un control de isotipo de la IgG₁. Las barras de error representan la desviación estándar de pocillos triplicados. En las Figuras 4B y 4C se muestran los resultados de un ensayo con el informante de IL-2-

luciferasa donde se observa el bloqueo de CTLA-4 conduce a la activación de células T. Se cocultivó una línea de células T humanas (Jurkat) que coexpresa CD3 y CD28, manipulada para expresar constitutivamente CTLA-4 sobre la superficie celular además de un gen informante de luciferasa bajo el control de un promotor de IL-2, con una línea de células presentadoras de antígenos (Raji) que expresaba CD80 y CD86. La Figura 4B es de un par de histogramas que muestran la expresión de CD80 y CD86 sobre células Raji medida mediante citometría de flujo. La señalización de TCR se desencadenó usando un anticuerpo anti-CD3 en la presencia de concentraciones crecientes de AGEN1884w o de un anticuerpo de control de isotipo de IgG₁. En la Figura 4C se muestra el aumento de expresión de luciferasa, un marcador sustituto de activación del gen de IL-2, como respuesta a concentraciones crecientes de AGEN1884w con relación al anticuerpo de control de isotipo. En las Figuras 4D y 4E se muestran los resultados de un ensayo que evalúa la capacidad del anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884w para disminuir la producción de IFN γ por células T CD8⁺ primarias en la presencia de concentraciones altas de anticuerpo anti-CD3. Se estimularon células T humanas primarias con un anticuerpo anti-CD3 (10 μ g/ml) en la presencia de concentraciones crecientes del AGEN1884w ya sea soluble (Figura 4D) o unido a placas (Figura 4E) o un anticuerpo de control de isotipo de IgG₁. Se grafica el porcentaje de células T CD8⁺ IFN γ ⁺ contra las concentraciones de anticuerpo evaluadas. La línea de puntos representa la frecuencia de células T CD8⁺ IFN γ ⁺ en la ausencia de estimulación del anticuerpo anti-CD3. La Figura 4F es un gráfico que muestra la actividad funcional del anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884w, ya sea solo o en combinación con un anticuerpo anti-LAG-3 AGEN1746, un anticuerpo anti-PD-1

Nivolumab o un anticuerpo anti-PD-1 Pembrolizumab, sobre cultivos de PBMC humanas primarias luego de estimulación con la enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA). Se muestra la media y la desviación estándar de la concentración de IL-2. IC representa el control de isotipo.

[0070] En la Figura 5A se muestran las afinidades de unión (K_D) de AGEN2041w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₂ de referencia por el CTLA-4 dimérico y monomérico recombinante humano y de cinomolgo medidas mediante resonancia de plasmón superficial. La Figura 5B es un gráfico que muestra la unión de AGEN2041w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₂ de referencia y un control de isotipo de IgG₂ a células que expresan CTLA-4 medida con un análisis de citometría de flujo. Se calculó y se graficó la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) contra las diferentes concentraciones de anticuerpo evaluadas. La Figura 5C es un gráfico donde se muestra el porcentaje de unión de CD80 y CD86 al CTLA-4 en la presencia de concentraciones crecientes de AGEN2041w o un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₂ de referencia (12, 37, 111, 333, 1000, 3000 y 9000 ng/ml antes de agregar las esferas) medida mediante tecnología de ordenamientos en suspensión. Las Figuras 5D y 5E son tablas similares a las que se muestran en las Figuras 1C y 1D, respectivamente, donde se evalúa la selectividad unión del AGEN2041w y un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₂ de referencia al CTLA-4 humano recombinante (rh) y de cinomolgo (rc), en comparación con miembros de familia relacionados (CD28, ICOS, BTLA y PD-1 humanos recombinantes; y PD-1 de cinomolgo recombinante), con relación a un anticuerpo de control de isotipo IgG₂. En la Figura 5D se muestran los valores de MFI medidos

mediante tecnología de ordenamientos en suspensión y la Figura 5E es un cuadro de síntesis basado en los datos indicados en la Figura 5D.

[0071] La Figura 6A representa la actividad funcional de anticuerpos anti-CTLA-4 sobre cultivos de PBMC humanas primarias luego de estimulación con la enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA). En la Figura 6A se muestra el cambio en la producción de IL-2 como respuesta a dosis de AGEN1884w y AGEN2041w, en comparación con los anticuerpos de control de isotipo IgG₁ y IgG₂. Las barras de error representan la desviación estándar de pocillos triplicados. La Figura 6B es un gráfico donde se muestran los resultados de un ensayo con el informante de IL-2-luciferasa que evalúa el AGEN2041w y un anticuerpo de control de isotipo de IgG₂. Se muestra el aumento de la expression de luciferasa, un marcador sustituto para la activación del gen de IL-2, para dosis crecientes de AGEN2041w y el anticuerpo de control de isotipo.

[0072] La Figura 7A es un gráfico donde se muestra la unión del AGEN1884w-105 (AGEN1884w producido por un clon estable 105), un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y un control de isotipo de IgG₁ a células que expresan CTLA-4 medida en un análisis de citometría de flujo. Se calculó y se graficó la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) contra titulación de un anticuerpo. La Figura 7B es el resultado de un ensayo que examina la producción de IL-2 mejorada por el AGEN1884w-105, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y un control de isotipo de IgG₁ después de la estimulación con la enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA). En la Figura 7B, se muestran seis replicas biológicas y los valores promedio (bar) de cambio de la IL-2.

[0073] En las Figuras 8A, 8B y 8C se muestran las curvas de unión de

una titulación de dosis de anticuerpos a células CHO que expresan FcγRIIA^{H131} (Figura 8A), FcγRIIB (Figura 8B) y FcγRIIA^{V158} (Figura 8C), respectivamente. Se grafica la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) del anticuerpo de detección secundario. Las barras de error representan la desviación estándar de triplicados. Los anticuerpos evaluados fueron AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO, AGEN2041w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y un anticuerpo de control de isotipo de IgG₁.

[0074] Las Figuras 9A y 9B son gráficos donde se muestra la respuesta promedio (unidades de respuesta, RU) de muestras por triplicado a un rango de concentraciones de anticuerpos de AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO, AGEN2041w y un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia unidos al FcγRIIA humano (Figura 9A) o FcγRIIA humano (Figura 9B) determinada mediante resonancia de plasmón superficial.

[0075] La Figura 10A es un esquema de un ensayo con informante del gen del receptor de Fc gamma IIIA (FcγRIIA). En las Figuras 10B-10G se muestran los resultados de un ensayo con informante en el cual se compara la capacidad de AGEN1884w-105 o AGEN1884w (AGEN1884w-105 en las Figuras 10B, 10C, 10F y 10G; AGEN1884w en las Figuras 10D y 10E) para activar una línea celular informante que expresa ya sea la variante FcγRIIA V158 o la variante FcγRIIA F158 con la capacidad de un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia (Figuras 10B y 10C), AGEN2041w (Figuras 10D y 10E) y una variante AGEN1884w N297A (Figuras 10F y 10G). Se grafican las unidades de luz relativas (RLU) contra un rango de concentraciones de anticuerpo.

[0076] La Figura 11 muestra el resultado de un ensayo con informante

en el cual se evaluó el AGEN2041w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₂ de referencia y un anticuerpo de control de isotipo de IgG₂ por su capacidad para activar una línea celular informante que expresa la variante FcγRIIA^{H131} cuando los anticuerpos se unían a células blanco que expresan CTLA-4. Se grafican las unidades de luz relativas (RLU) contra un rango de concentraciones de anticuerpo.

[0077] La Figura 12A es un gráfico que muestra la unión de AGEN1884w-105, una variante de AGEN1884w-N297A y un control de isotipo de IgG₁ a células que expresan CTLA-4 media con un análisis de citometría de flujo. Se calculó y se graficó la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) contra las diferentes concentraciones de anticuerpo evaluadas. La Figura 12B es el resultado de un ensayo que examina la producción de IL-2 inducida por el AGEN1884w-105, AGEN1884w-N297A y un control de isotipo de IgG₁ después de la estimulación con la enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA). En la Figura 12B, se muestran seis replicas biológicas y los valores promedio (bar) de cambio de la IL-2.

[0078] En las Figuras 13A y 13B se muestran los resultados de un ensayo que examina el impacto de bloquear la unión del FcR sobre la actividad antagonista de anticuerpos anti-CTLA-4. En la Figura 13A, se muestran siete replicas biológicas y los valores promedio (bar) de cambio de la IL-2. En la Figura 13B, se muestran siete réplicas biológicas de la producción de IL-2 (pg/ml).

[0079] La Figura 14 es un gráfico donde se muestra la producción de IL-2 por las PBMC humanas luego de estimulación con la enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA) como respuesta a 10 µg/ml de AGEN1884w,

AGEN1884w-N297A, AGEN1884w-S267E/L328F, AGEN1884w-S239D/A330L/I332E, AGEN2041w, un anticuerpo de control de isotipo de IgG₁ o un anticuerpo de control de isotipo de IgG₂. Se muestran los valores promedio (bar) de la producción de IL-2 para cada anticuerpo evaluado.

[0080] La Figura 15 es un gráfico donde se muestra el porcentaje de lisis de células blanco en la presencia de células efectoras junto con una titulación de dosis de AGEN1884w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia o un anticuerpo de control de isotipo. Se usaron células Jurkat manipuladas para expresar constitutivamente el CTLA-4 sobre la superficie celular como células blanco y células NK92-FcγRIIIA como células efectoras.

[0081] En la Figura 16 se comparan las afinidades de unión (K_D) de CD80-Fc-His, CD86-Fc-His, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y AGEN1884 por CTLA-4. Walker y Sansom *Nat. Rev. Immunology* 2011 refieren a Walker y Sansom *Nat. Rev. Immunol.* (2011) 11(12): 852-63. Xu *et al.*, *J Immunol.* (2012) 189(9): 4470-7.

[0082] La Figura 17A es un alineamiento de las secuencias del CTLA-4 humano (SEQ ID N°: 77), CTLA-4 de mono cinomolgo (SEQ ID N°: 84), CTLA-4 de ratón (SEQ ID N°: 85) y CTLA-4 de rata (SEQ ID N°: 86). Los puntos representan residuos idénticos a los correspondientes residuos humanos. Un * (asterisco) indica las posiciones que tienen un solo residuo completamente conservado. El símbolo : (dos puntos) indica conservación entre grupos de propiedades fuertemente similares. Un . (punto) indica conservación entre grupos de propiedades débilmente similares. Las Figuras 17B y 17C son alineamientos de secuencia del CTLA-4 humano (SEQ ID N°: 77), CTLA-4 de mono cinomolgo (SEQ ID N°: 84), CD28 humano (SEQ ID N°: 87), ICOS

humano (SEQ ID N°: 88), BTLA humano (SEQ ID N°: 89) y PD-1 humano (SEQ ID N°: 90). Las dos regiones que muestran una fuerte disminución de la captación de deuterio cuando el CTLA-4 humano se unía a AGEN1884w-Fab están subrayadas en las Figuras 17A-C: Q⁸⁰VT⁸² y Y¹³⁵PPPYLIGINGTQI¹⁴⁹. La Figura 17D es un ensamblaje compuesto de las coordenadas por rayos X en los archivos de la Base de Datos de proteínas, 3osk y 1i8l. Este análisis estructural compuesto indica una agrupación tipo cadena de margarita de los agrupamientos CTLA-4 y B7-1. Esto provee un modelo del dímero B7-1 humano junto con el dímero CTLA-4 humano que se cree es la forma oligomérica más simple del complejo inmunológico de señalización competente. El sitio de contacto entre CTLA-4 y B7-1 incluye la región M¹³⁴YPPPY¹⁴⁰ pero no se limita a este motivo particular. La Figura 17E es un modelo de la unión de AGEN1884w-Fab con el CTLA-4 humano. Todos los residuos de CTLA-4 indicados en la descripción precedente de las Figuras 17A-17E están numerados de acuerdo con la SEQ ID N°: 77.

[0083] En las Figuras 18A y 18B se muestran los resultados de un estudio de respuesta al antígeno dependiente de células T (TDAR) en monos cinomolgos. Se suministró AGEN1884w (10 mg/kg), un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia (3 mg/kg) (Figura 18A), AGEN2041w (10 mg/kg) (Figura 18B) o un artículo control (Figuras 18A y 18B) mediante administración intravenosa (bolo lento) junto con vacunas HBsAg (30 µg en la pata trasera) los Días 1 y 29. Se analizaron muestras por duplicado por los títulos anti-HBsAg (IgG) en suero usando un ELISA. Los puntos de datos representan la media ± EEM en cada grupo de tratamiento.

[0084] Las Figuras 19A y 19B son alineamientos de secuencias de las

cadenas pesadas variables BADD411-2354 (SEQ ID N°: 7), BADD412-2356 (SEQ ID N°: 38), BADD412-2357 (SEQ ID N°: 39), BADD412-2358 (SEQ ID N°: 40), BADD412-2359 (SEQ ID N°: 41) y BADD412-2360 (SEQ ID N°: 42) y cadenas livianas variables BADD412-2367 (SEQ ID N°: 43), BADD412-2376 (SEQ ID N°: 8), BADD412-2382 (SEQ ID N°: 44), BADD412-2384 (SEQ ID N°: 45), BADD412-2390 (SEQ ID N°: 46) y BADD412-2393 (SEQ ID N°: 47), respectivamente. Las CDR de las cadenas pesada y liviana indicadas se determinan de acuerdo con Kabat.

[0085] Las Figuras 20A-20E son gráficos que muestran el porcentaje de la unión del CD80-PE o CD86-PE recombinante a esferas acopladas a CTLA-4 en la presencia de una titulación de dosis de 19 anticuerpos anti-CTLA-4 (AGEN1884-AGEN1902) medido mediante tecnología de ordenamientos en suspensión.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0086] La presente divulgación provee anticuerpos que se unen específicamente al CTLA-4 humano y antagonizan la función del CTLA-4, por ejemplo, una supresión inmune mediado por CTLA-4. También se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos, ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos, vectores de expresión y células huésped para elaborar estos anticuerpos, y métodos de tratamiento de un sujeto usando estos anticuerpos. Los anticuerpos divulgados en la presente son de particular utilidad para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno (por ejemplo, un antígeno tumoral) y por ende para el tratamiento de cáncer, o para prevenir o tratar enfermedades infecciosas en un sujeto. Los anticuerpos divulgados en la presente también son de utilidad para

su uso en composiciones farmacéuticas en el tratamiento, o en la elaboración de medicamentos, para tratar cáncer, o para prevenir o tratar enfermedades infecciosas.

5.1 *Definiciones*

[0087] Según se usan en la presente, los términos “aproximadamente” y “alrededor de”, cuando se usan para modificar un valor numérico o un rango numérico, indican que las desviaciones de entre un 5% y un 10% por encima y entre un 5% y un 10% por debajo de dicho valor o rango se encuentran dentro del significado pretendido del valor o rango indicado.

[0088] Según se usa en la presente, el término "CTLA-4" se refiere a la proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxica. Las secuencias de nucleótidos y polipéptidos de CTLA-4 son bien conocidas en el arte. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la CTLA-4 humana se encuentra en GenBank, depósito GI: 15778585 y un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la CTLA-4 ratón se encuentra en GenBank, depósito GI: 15778586.

[0089] Según se usa en la presente, los términos “anticuerpo” y “anticuerpos” incluyen anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno y moléculas que comprenden CDR, regiones VH o regiones VL de anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de manera recombinante, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (que incluyen anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, inmunoglobulinas, anticuerpos sintéticos, anticuerpos tetraméricos que comprenden dos moléculas de la cadena pesada y dos de la cadena liviana, un monómero de la cadena liviana del anticuerpo, un

monómero de la cadena pesada del anticuerpo, un dímero de la cadena liviana del anticuerpo, un dímero de la cadena pesada del anticuerpo, un par de cadena liviana de anticuerpo-cadena pesada de anticuerpo, *intrabodies*, anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos de dominio simple, anticuerpos monovalentes, anticuerpos de cadena simple o Fvs de cadena simple (scFv), anticuerpos camelizados, *affybodies*, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fvs unidos mediante enlaces disulfuro (sdFv), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (que incluyen, por ejemplo, anticuerpos anti-anti-Id) y fragmentos de unión al antígeno de cualquiera de los mencionados. En determinadas formas de realización, los anticuerpos que se describen en la presente se refieren a poblaciones de anticuerpos policlonales. Los anticuerpos pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY), de cualquier clase (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ o IgA₂) o de cualquier subclase (por ejemplo, IgG_{2a} o IgG_{2b}) de moléculas de inmunoglobulina. En determinadas formas de realización, los anticuerpos que se describen en la presente son anticuerpos IgG, o una clase (por ejemplo, IgG₁ o IgG₄ humana) o una subclase de los mismos. En una forma de realización específica, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado. En otra forma de realización específica, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano. En determinadas formas de realización, un anticuerpo descrito en la presente es un anticuerpo de IgG₁ o IgG₂.

[0090] Según se usa en la presente, los términos "región VH" y "región VL" se refieren a regiones variables simples de la cadena pesada y liviana del anticuerpo, respectivamente, que comprende las FR (regiones de marco de trabajo) 1, 2, 3 y 4 y las CDR (regiones determinantes de complementariedad)

1, 2 y 3 (véase Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (publicación del NIH N°: 91-3242, Bethesda).

[0091] Según se usa en la presente, el término "CDR" o "región determinante de complementariedad" se refiere a los sitios de combinación de antígenos no contiguos presentes dentro de la región variable de polipéptidos de las cadenas pesada y liviana. Estas regiones particulares fueron descritas por Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) y Kabat et al., *Sequences of protein of immunological interest*, (1991) y por Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987) y por MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996), donde dichas definiciones incluyen superposiciones o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Los residuos de aminoácidos que abarcan las CDR definidas en cada una de las referencias citadas precedentemente se describen a efectos comparativos. Preferiblemente, el término "CDR" es una CDR definida por Kabat, basada en comparaciones de secuencia. CDRH1, CDRH2 y CDRH3 indican las CDR de la cadena pesada y CDRL1, CDRL2 y CDRL3 indican las CDR de la cadena liviana.

[0092] Según se usa en la presente, el término "sistema de numeración EU" se refiere a la convención de numeración EU para las regiones constantes de un anticuerpo, como se describe en Edelman, G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969) y Kabat et al, en "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*", U.S. Dept. Health y Human Services, 5ª edición, 1991.

[0093] Según se emplea en la presente, el término "residuos de aminoácidos del marco de trabajo (FR) de la región variable" hace referencia a aquellos aminoácidos en la región del marco de trabajo de una cadena de

inmunoglobulina. Los términos “región de marco de trabajo” y “región FR”, tal como se utilizan en la presente, hacen referencia a los residuos de aminoácidos que forman parte de la región variable pero que no forman parte de las CDR (por ejemplo, de acuerdo con la definición de Kabat de las CDR).

[0094] Según se usa en la presente, el término “afucosilación” o “afucosilado”, en el contexto de un Fc, se refiere a una falta sustancial de una fucosa unida covalentemente, ya sea de manera directa o indirecta, al residuo 297 de la región Fc de la IgG1 humana, numerado de acuerdo con el índice EU (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), o el residuo correspondiente en las inmunoglobulinas no IgG1 o IgG1 no humanas. Por consiguiente, en una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos afucosilados, por lo menos un 70% de los anticuerpos no estarán fucosilados, de manera directa o indirecta (por ejemplo, por azúcares intervinientes) en el residuo 297 de la región Fc de los anticuerpos y en algunas formas de realización por lo menos un 80%, un 85%, un 90%, un 95% o un 99% no estará fucosilado, de manera directa o indirecta, en el residuo 297 de la región Fc.

[0095] Según se usa en la presente, el término "se une específicamente a" se refiere a la capacidad de un anticuerpo para unirse a un antígeno con una constante de disociación (Kd) de por lo menos aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M o menos, y/o para unirse a un antígeno con una afinidad que es por lo menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico.

[0096] Según se usa en la presente, un “epitope” es un término del arte y

se refiere a una región localizada de un antígeno a la cual un anticuerpo se puede unir específicamente. Un epítopo puede comprender, por ejemplo, aminoácidos contiguos de un polipéptido (epítopo lineal o contiguo) o un epítopo puede provenir, por ejemplo, de dos o más regiones no contiguas de un polipéptido o de polipéptidos (epítopo de conformación, no lineal, discontinuo o no contiguo). En determinadas formas de realización, el epítopo al cual se une un anticuerpo se puede determinar, por ejemplo, mediante espectroscopía de NMR, estudios de cristalografía por difracción de rayos X, ensayos ELISA, intercambio de hidrógeno/deuterio acoplado con espectrometría de masas (por ejemplo, cromatografía líquida-espectrometría de masas con electroatomización), ensayos de barrido de oligopéptidos basados en ordenamientos y/o mapeo por mutagénesis (por ejemplo, mapeo por mutagénesis dirigida al sitio). Para la cristalografía por rayos X, la cristalización se efectúa usando cualquiera de los métodos conocidos en el arte (por ejemplo, Giegé R *et al.*, (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Los cristales de anticuerpo:antígeno se pueden estudiar usando técnicas de difracción por rayos X bien conocidas y se pueden refinar usando un software para computadora, tal como X-PLOR (Yale University, 1992, distribuido por Molecular Simulations, Inc.; véase, por ejemplo, *Meth Enzymol* (1985) volúmenes 114 y 115, eds Wyckoff HW *et al.*; US 2004/0014194) y BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P *et al.*, (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Los estudios de

mapeo por mutagénesis se pueden efectuar usando cualquier método conocido por un especialista en el arte. Véase, por ejemplo, Champe M *et al.*, (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 y Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085 por una descripción de las técnicas de mutagénesis, incluyendo las técnicas de mutagénesis por barrido de alanina. En una forma de realización específica, el epítopo de un anticuerpo o de un fragmento de unión al antígeno del mismo se determina usando estudios de mutagénesis por barrido de alanina.

[0097] Según se usa en la presente, el término "tratar", "tratando" y "tratamiento" se refieren a las medidas terapéuticas o preventivas que se describen en la presente. Los métodos de "tratamiento" emplean la administración de un anticuerpo a un sujeto que sufre de una enfermedad o trastorno, o que está predispuesto a padecer dicha enfermedad o trastorno, a fin de prevenir, curar, demorar, reducir la severidad o aliviar uno o más síntomas de la enfermedad o del trastorno o de una enfermedad o trastorno recurrente o a fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en la ausencia de dicho tratamiento.

[0098] Según se usa en la presente, el término "cantidad eficaz" en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refiere a la cantidad de una terapia que permite lograr un efecto profiláctico o terapéutico deseado.

[0099] Según se usa en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano.

[00100] El intercambio de hidrógeno-deuterio se evalúa usando un ensayo que comprende los siguientes pasos: (a) tomar una solución de CTLA-4 solamente o de CTLA-4 en combinación con un anticuerpo en una solución

amortiguadora acuosa y diluir esta solución en un exceso de aproximadamente un 90% volumen/volumen de solución amortiguadora para marcar con óxido de deuterio durante, por ejemplo, 0, 60, 300, 1800 y 7200 segundos; (b) detener el intercambio de hidrógeno por deuterio mediante disminución del pH; (c) someter las muestras a digestión con proteasa y análisis por espectrometría de masas; y (d) calcular la incorporación de deuterio en los péptidos proteolíticos CTLA-4 y comparar la incorporación de deuterio en la presencia o ausencia del anticuerpo. El intercambio de hidrógeno por deuterio en un péptido proteolítico CTLA-4 está “reducido” si el intercambio de hidrógeno/deuterio en la presencia de un anticuerpo anti-CTLA-4 se reduce en por lo menos un 10% con relación al intercambio de hidrógeno/deuterio en la ausencia del anticuerpo, evaluado mediante el ensayo precedente.

5.2 Anticuerpos anti-CTLA-4

[00101] En un aspecto, la presente divulgación provee anticuerpos que se unen específicamente al CTLA-4 humano y antagonizan la función del CTLA-4. Las secuencias de aminoácidos de los ejemplos de anticuerpos se ilustran en las Tablas 1-6, en la presente.

Tabla 1: Secuencias de regiones variables, CDR y marcos de trabajo

(FR) de los ejemplos de anticuerpos anti-CTLA-4

SEQ ID N°	Descripción	Secuencia de aminoácidos
1	CDRH1 de Kabat (AGEN1884w)	YSMN
2	CDRH2 de Kabat (AGEN1884w)	SISSSSSYIYYADSVKG
3	CDRH3 de Kabat (AGEN1884w)	VGLMGPFDI
4	CDRL1 de Kabat (AGEN1884w)	RASQSVSRYL
5	CDRL2 de Kabat (AGEN1884w)	GASTRAT

6	CDRL3 de Kabat (AGEN1884w)	QQYGSSPWT
7	VH (AGEN1884w)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTV TVSS
8	VL (AGEN1884w)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSV SRYLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYY CQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
9	Secuencia de línea germinal: IGHV3-21*01	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCAR
10	Secuencia de línea germinal: IGKV3-20*01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSV SSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRAT GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQYGSSP
11	Secuencia de línea germinal: IGKV3-11*01	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC QQRSNWPP
12	cadena pesada de longitud completa AGEN1884w (con lisina C-terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
93	cadena pesada de longitud completa AGEN1884w (sin lisina C-terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL

		GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
13	secuencia de la cadena liviana de longitud completa AGEN1884w	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSV SRYLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYY CQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
14	cadena pesada de longitud completa AGEN2041w (con lisina C-terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPMMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
94	cadena pesada de longitud completa AGEN2041w (sin lisina C-terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTV TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYT CNVDHKPSNTKVDKTKVERKCCVECP APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC

		VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG
15	secuencia de la cadena liviana de longitud completa AGEN1884	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSV SRYLGWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYY CQQYGSSPWTFTGQGTKVEIKRSVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
16	IMGT CDRH1 (AGEN1884w)	GFTFSSYS
17	IMGT CDRH2 (AGEN1884w)	ISSSSSYI
18	IMGT CDRH3 (AGEN1884w)	ARVGLMGPFDI
19	IMGT CDRL1 (AGEN1884w)	QSVSRY
20	IMGT CDRL2 (AGEN1884w)	GAS
21	IMGT CDRL3 (AGEN1884w)	QQYGSSPWT
22	secuencia consenso de la CDRH1	SYX_1MX_2 , en donde X_1 es S o A; y X_2 es N o S
23	secuencia consenso de la CDRH3	VGLMGPFXI, en donde X es D o N;
24	secuencia consenso de la CDRL1	$RASQSVX_1X_2Y LX_3$, en donde X_1 es S o G; X_2 es R, S o T; y X_3 es G o A
25	secuencia consenso de la CDRL2	$X_1X_2SX_3RAT$, en donde X_1 es G o A; X_2 es A o T; y X_3 es T, S, R o N
26	secuencia consenso de la CDRL3	$QQYGX_1SPX_2T$, en donde X_1 es S o T; y X_2 es W o F
27	CDRH1	SYAMS

28	CDRH3	VGLMGPFNI
29	CDRL1	RASQSVSSYLA
30	CDRL1	RASQSVGTYLA
31	CDRL2	GASRRAT
32	CDRL2	ATSSRAT
33	CDRL2	GASSRAT
34	CDRL2	AASTRAT
35	CDRL2	GASNRAT
36	CDRL3	QQYGTSPWT
37	CDRL3	QQYGSSPFT
38	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLVWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTV TVSS
39	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTV TVSS
40	VH	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF SSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSSY IYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTV TVSS
41	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMSWVRQAPGKGLVWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFNIWGQGTMTV TVSS
42	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTV TVSS
43	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV GTYLAWYQHKVGQAPRLLIYGASRRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSPWTFTGQGTKVEIK
44	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS SYLAWYQQKPGQAPSLLIYATSSRATGIP DRFSGSVSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQYGTSPWTFTGQGTKVEIK
45	VL	EIVLTQSPATLSFSPGERATLSCRASQSVS

		SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTFTISRLEPEDFAVYYC QQYGSSPFTFGPGTKVDIK
46	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSV SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYAASTRATGI PDRFSGSASGTDFTLTISRLEPEDFAVYY CQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
47	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVS SYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRAATGIP ARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC QQYGSSPFTFGPGTKVDIK
48	VH FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FS
49	VH FR2	WVRQAPGKGLEWVS
50	VH FR3	RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CAR
51	VH FR4	WGQGTMTVSS
52	VH FR1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FS
53	VH FR2	WVRQAPGKGLWVS
54	VH FR3	RFTISRDNANKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAR
55	VH FR1	EVQLLES GGGLVVKPGGSLRLSCAASGFTF S
56	VH FR1	EVQLVES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFT FS
57	VL FR1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC
58	VL FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
59	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVY YC
60	VL FR4	FGQGTKVEIK
61	VL FR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
62	VL FR2	WYQHKVGQAPRLLIY
63	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YC
64	VL FR2	WYQQKPGQAPSLLIY
65	VL FR3	GIPDRFSGSVSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YC
66	VL FR1	EIVLTQSPATLSFSPGERATLSC
67	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTFTISRLEPEDFAVY YC
68	VL FR4	FGPGTKVDIK
69	VL FR1	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSC

70	VL FR3	GIPDRFSGSASGTDFTLTISRLEPEDFAVY YC
71	VL FR3	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVY YC
72	secuencia consenso VH	EVQLX ₁ ESGGGLVX ₂ PGGSLX ₃ LSCAASGF TFSSYX ₄ MX ₅ WVRQAPGKGLX ₆ WVSSISS SSSYIYYADSVKGRFTISRDNAX ₇ LYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFX ₈ IWG QGTMTVSS, en donde X ₁ es V o L; X ₂ es K o Q; X ₃ es R o T; X ₄ es S o A; X ₅ es N o S; X ₆ es E o V; X ₇ es S o T; y X ₈ es D o N
73	secuencia consenso VL	EIVLTQSPX ₁ TLX ₂ SPGERATLSCRASQS VX ₃ X ₄ YLX ₅ WYQX ₆ KX ₇ GQAPX ₈ LLIYX ₉ X ₁₀ S X ₁₁ RATGIPX ₁₂ RFSGSX ₁₃ SGTDFTX ₁₄ TIX ₁₅ X ₁₆ LEPEDFAVYYCQYGX ₁₇ SPX ₁₈ TFGX ₁₉ GTKVX ₂₀ IK, en donde X ₁ es G o A; X ₂ es L, V, o F; X ₃ es S o G; X ₄ es R, T, o S; X ₅ es G o A; X ₆ es Q o H; X ₇ es P o V; X ₈ es R o S; X ₉ es G o A; X ₁₀ es A o T; X ₁₁ es T, R, S, o N; X ₁₂ es D o A; X ₁₃ es G, V, o A; X ₁₄ es L o F; X ₁₅ es T o S; X ₁₆ es R o S; X ₁₇ es S o T; X ₁₈ es W o F; X ₁₉ es Q o P; y X ₂₀ es E o D
74	cadena pesada de longitud completa	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS

	AGEN1884w N297A (con lisina C-terminal)	YIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
95	cadena pesada de longitud completa AGEN1884w N297A (sin lisina C-terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
75	cadena pesada de longitud completa AGEN1884w S267E/L328F (con lisina C-terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKAFAPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS

		GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
96	cadena pesada de longitud completa AGEN1884w S267E/L328F (sin lisina C-terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKVSNKAFFPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
76	cadena pesada de longitud completa AGEN1884w S239D/A330L/I332 E (con lisina C-terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
97	cadena pesada de longitud completa AGEN1884w S239D/A330L/I332 E (sin lisina C-terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFT FSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSS YIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN

		AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG
--	--	--

Tabla 2: Secuencias de CDR de la cadena pesada de los ejemplos de anticuerpos anti-CTLA-4 ¹

ANTICUERPO	CDRH1 (SEQ ID N°:)	CDRH2 (SEQ ID N°:)	CDRH3 (SEQ ID N°:)
AGEN1884w	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1885	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1886	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1887	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1888	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1889	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1890	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1891	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1892	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1893	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1894	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1895	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1896	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1897	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1898	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1899	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1900	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1901	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1902	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)

¹ Las CDR VH de la Tabla 2 se determinan de acuerdo con Kabat.

Tabla 3: Secuencias de CDR de la cadena liviana de los ejemplos de anticuerpos anti-CTLA-4 ²

ANTICUERPO	CDRL1 (SEQ ID N°:)	CDRL2 (SEQ ID N°:)	CDRL3 (SEQ ID N°:)
AGEN1884w	RASQSVSRYLG (4)	GASTRAT (5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1885	RASQSVSSYLA (29)	ATSSRAT (32)	QQYGTSPWT (36)
AGEN1886	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1887	RASQSVSRYLG (4)	GASTRAT (5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1888	RASQSVSSYLA	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)

	(29)		
AGEN1889	RASQSVGTYLA (30)	GASRRAT (31)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1890	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1891	RASQSVSSYLA (29)	AASTRAT (34)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1892	RASQSVSSYLA (29)	GASNRAT (35)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1893	RASQSVGTYLA (30)	GASRRAT (31)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1894	RASQSVSRYLG (4)	GASTRAT (5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1895	RASQSVSSYLA (29)	ATSSRAT (32)	QQYGTSPWT (36)
AGEN1896	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1897	RASQSVSRYLG (4)	GASTRAT (5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1898	RASQSVSSYLA (29)	ATSSRAT (32)	QQYGTSPWT (36)
AGEN1899	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1900	RASQSVSSYLA (29)	GASNRAT (35)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1901	RASQSVGTYLA (30)	GASRRAT (31)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1902	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)

² Las CDR VL de la Tabla 3 se determinan de acuerdo con Kabat.

Tabla 4: Secuencias de marco de trabajo (FR) de VH de los ejemplos de anticuerpos anti-CTLA-4 ³

ANTICUERPO	VH FR1 (SEQ ID N°:)	VH FR2 (SEQ ID N°:)	VH FR3 (SEQ ID N°:)	VH FR4 (SEQ ID N°:)
AGEN1884w	EVQLVESGGG LVKPGGSLRLS CAASGFTFS (48)	WVRQAPGK GLEWVS (49)	RFTISRDNAKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV VSS (51)
AGEN1885	EVQLVESGGG LVKPGGSLRLS CAASGFTFS (48)	WVRQAPGK GLEWVS (49)	RFTISRDNAKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV VSS (51)
AGEN1886	EVQLVESGGG	WVRQAPGK	RFTISRDNAKN	WGQGTMTV

	LVKPGGSLRLS CAASGFTFS (48)	GLEWVS (49)	SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	VSS (51)
AGEN1887	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS (52)	WVRQAPGK GLWVVS (53)	RFTISRDNAKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV VSS (51)
AGEN1888	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS (52)	WVRQAPGK GLWVVS (53)	RFTISRDNAKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV VSS (51)
AGEN1889	EVQLVESGGG LVKPGGSLRLS CAASGFTFS (48)	WVRQAPGK GLEWVS (49)	RFTISRDNAKN TLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTV VSS (51)
AGEN1890	EVQLVESGGG LVKPGGSLRLS CAASGFTFS (48)	WVRQAPGK GLEWVS (49)	RFTISRDNAKN TLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTV VSS (51)
AGEN1891	EVQLVESGGG LVKPGGSLRLS CAASGFTFS (48)	WVRQAPGK GLEWVS (49)	RFTISRDNAKN TLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTV VSS (51)
AGEN1892	EVQLVESGGG LVKPGGSLRLS CAASGFTFS (48)	WVRQAPGK GLEWVS (49)	RFTISRDNAKN TLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTV VSS (51)
AGEN1893	EVQLLESGGG LVKPGGSLRLS CAASGFTFS (55)	WVRQAPGK GLEWVS (49)	RFTISRDNAKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV VSS (51)
AGEN1894	EVQLLESGGG LVKPGGSLRLS CAASGFTFS (55)	WVRQAPGK GLEWVS (49)	RFTISRDNAKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV VSS (51)
AGEN1895	EVQLLESGGG LVKPGGSLRLS CAASGFTFS (55)	WVRQAPGK GLEWVS (49)	RFTISRDNAKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV VSS (51)
AGEN1896	EVQLLESGGG LVKPGGSLRLS CAASGFTFS (55)	WVRQAPGK GLEWVS (49)	RFTISRDNAKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV VSS (51)
AGEN1897	EVQLLESGGG	WVRQAPGK	RFTISRDNAKN	WGQGTMTV

	LVQPGGSLRL SCAASGFTFS (52)	GLWVVS (53)	SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	VSS (51)
AGEN1898	EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS (52)	WVRQAPGK GLWVVS (53)	RFTISRDN AKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	WGQGTMVT VSS (51)
AGEN1899	EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS (52)	WVRQAPGK GLWVVS (53)	RFTISRDN AKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	WGQGTMVT VSS (51)
AGEN1900	EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS (52)	WVRQAPGK GLWVVS (53)	RFTISRDN AKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	WGQGTMVT VSS (51)
AGEN1901	EVQLVES GGG LVQPGGSLTLS CAASGFTFS (56)	WVRQAPGK GLEWVS (49)	RFTISRDN AKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	WGQGTMVT VSS (51)
AGEN1902	EVQLVES GGG LVQPGGSLTLS CAASGFTFS (56)	WVRQAPGK GLEWVS (49)	RFTISRDN AKN SLYLQMNSLRA EDTAVYYCAR (50)	WGQGTMVT VSS (51)

³ Las regiones de marco de trabajo de VH descritas en la Tabla 4 se determinan basado en los límites del sistema de numeración de Kabat para CDR. En otras palabras, las CDR VH se determinan por Kabat y las regiones de marco de trabajo son los residuos de aminoácidos que rodean las CDR en la región variable en el formato FR1, CDRH1, FR2, CDRH2, FR3, CDRH3 y FR4.

Tabla 5: Secuencias de marco de trabajo (FR) de VL de los ejemplos de anticuerpos anti-CTLA-4 ⁴

ANTICUERPO	VL FR1 (SEQ ID N°:)	VL FR2 (SEQ ID N°:)	VL FR3 (SEQ ID N°:)	VL FR4 (SEQ ID N°:)
AGEN1884w	EIVLTQSPG TSLSPGER ATLSC (57)	WYQQKPGQ APRLLIY (58)	GIPDRFSGS GSGTDFTLTI TRLEPEDFAV YYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1885	EIVLTQSPA	WYQQKPGQ	GIPDRFSGSV	FGQGTKVEIK

	TLSLSPGER ATLSC (61)	APSLLIY (64)	SGTDFTLTIS RLEPEDFAV YYC (63)	(60)
AGEN1886	EIVLTQSPA TLSFSPGER ATLSC (66)	WYQQKPGQ APRLLIY (58)	GIPDRFSGS GSGTDFTFTI SRLEPEDFA VYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1887	EIVLTQSPG TLSLSPGER ATLSC (57)	WYQQKPGQ APRLLIY (58)	GIPDRFSGS GSGTDFTLTI TRLEPEDFAV YYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1888	EIVLTQSPA TLSFSPGER ATLSC (66)	WYQQKPGQ APRLLIY (58)	GIPDRFSGS GSGTDFTFTI SRLEPEDFA VYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1889	EIVLTQSPA TLSLSPGER ATLSC (61)	WYQHKVGQ APRLLIY (62)	GIPDRFSGS GSGTDFTLTI SRLEPEDFA VYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1890	EIVLTQSPA TLSFSPGER ATLSC (66)	WYQQKPGQ APRLLIY (58)	GIPDRFSGS GSGTDFTFTI SRLEPEDFA VYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1891	EIVLTQSPA TLSPVSGE RATLSC (69)	WYQQKPGQ APRLLIY (58)	GIPDRFSGSA SGTDFTLTIS RLEPEDFAV YYC (70)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1892	EIVLTQSPA TLSLSPGER ATLSC (61)	WYQQKPGQ APRLLIY (58)	GIPARFSGS GSGTDFTLTI SSLEPEDFAV YYC (71)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1893	EIVLTQSPA TLSLSPGER ATLSC (61)	WYQHKVGQ APRLLIY (62)	GIPDRFSGS GSGTDFTLTI SRLEPEDFA VYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1894	EIVLTQSPG TLSLSPGER ATLSC (57)	WYQQKPGQ APRLLIY (58)	GIPDRFSGS GSGTDFTLTI TRLEPEDFAV YYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1895	EIVLTQSPA TLSLSPGER ATLSC (61)	WYQQKPGQ APSLLIY (64)	GIPDRFSGSV SGTDFTLTIS RLEPEDFAV YYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1896	EIVLTQSPA	WYQQKPGQ	GIPDRFSGS	FGPGTKVDIK

	TLSFSPGER ATLSC (66)	APRLLIY (58)	GSGTDFTFTI SRLEPEDFA VYYC (67)	(68)
AGEN1897	EIVLTQSPG TLSLSPGER ATLSC (57)	WYQQKPGQ APRLLIY (58)	GIPDRFSGS GSGTDFTLTI TRLEPEDFAV YYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1898	EIVLTQSPA TLSLSPGER ATLSC (61)	WYQQKPGQ APSLLIY (64)	GIPDRFSGSV SGTDFTLTIS RLEPEDFAV YYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1899	EIVLTQSPA TLSFSPGER ATLSC (66)	WYQQKPGQ APRLLIY (58)	GIPDRFSGS GSGTDFTFTI SRLEPEDFA VYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1900	EIVLTQSPA TLSLSPGER ATLSC (61)	WYQQKPGQ APRLLIY (58)	GIPARFSGS GSGTDFTLTI SSLEPEDFAV YYC (71)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1901	EIVLTQSPA TLSLSPGER ATLSC (61)	WYQHKVGQ APRLLIY (62)	GIPDRFSGS GSGTDFTLTI SRLEPEDFA VYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1902	EIVLTQSPA TLSFSPGER ATLSC (66)	WYQQKPGQ APRLLIY (58)	GIPDRFSGS GSGTDFTFTI SRLEPEDFA VYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)

⁴ Las regiones de marco de trabajo de VL descritas en la Tabla 5 se determinan basado en los límites del sistema de numeración de Kabat para CDR. En otras palabras, las CDR VL se determinan por Kabat y las regiones de marco de trabajo son los residuos de aminoácidos que rodean las CDR en la región variable en el formato FR1, CDRL1, FR2, CDRL2, FR3, CDRL3 y FR4.

Tabla 6: Secuencias de VH y VL de los ejemplos de anticuerpos anti-CTLA-4

Anticuerpo	Región variable de la cadena pesada	SEQ ID N°	Región variable de la cadena liviana	SEQ ID N°
------------	-------------------------------------	-----------	--------------------------------------	-----------

AGEN1884w	BADD411-2354	7	BADD412-2376	8
AGEN1885	BADD411-2354	7	BADD412-2382	44
AGEN1886	BADD411-2354	7	BADD412-2384	45
AGEN1887	BADD412-2356	38	BADD412-2376	8
AGEN1888	BADD412-2356	38	BADD412-2384	45
AGEN1889	BADD412-2357	39	BADD412-2367	43
AGEN1890	BADD412-2357	39	BADD412-2384	45
AGEN1891	BADD412-2357	39	BADD412-2390	46
AGEN1892	BADD412-2357	39	BADD412-2393	47
AGEN1893	BADD412-2358	40	BADD412-2367	43
AGEN1894	BADD412-2358	40	BADD412-2376	8
AGEN1895	BADD412-2358	40	BADD412-2382	44
AGEN1896	BADD412-2358	40	BADD412-2384	45
AGEN1897	BADD412-2359	41	BADD412-2376	8
AGEN1898	BADD412-2359	41	BADD412-2382	44
AGEN1899	BADD412-2359	41	BADD412-2384	45
AGEN1900	BADD412-2359	41	BADD412-2393	47
AGEN1901	BADD412-2360	42	BADD412-2367	43
AGEN1902	BADD412-2360	42	BADD412-2384	45

Tabla 7: Ejemplos de secuencias de CTLA-4 y miembros de familia

SEQ ID N°	Descripción	Secuencia de aminoácidos
77	CTLA-4 humano (P16410)	MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFI PVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIAFVCEYA SPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMM GNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAM DTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDP EPCPDSDFLWLAAVSSGLFFYSFLLTAVSL SKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPECEKQFQ PYFIPIN
78	Epitope de CTLA-4	QVT
79	Epitope de CTLA-4	YPPPYLIGINGTQI
80	Epitope de CTLA-4	YLG I
81	Epitope de CTLA-4	MYPPPY
82	Epitope de CTLA-4	YPPPYLGI
83	Epitope de CTLA-4	YLGINGTQI

84	CTLA-4 MACFA (G7PL88)	MACLGFRHKAARLNLATRTRPYTLFLSLLFI PVFSKAMHVAQPAVVLANSRGIAFVCEYA SPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMM GNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAM DTGLYICKVELMYPPPYMGIGNGTQIYVIDP EPCPDSDFLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL SKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPECEKQFQ PYFIPIN
85	CTLA-4 de ratón (P09793)	MACLGLRRYKAQLQLPSRTWPFVALLTLLFI PVFSEAIQVTQPSVVLASSHGVAFPCEYSP SHNTDEVVRVTVLRQTNDQMTEVCATTFTK NTVGFLDYPFCSGTFNESRVNLTIQGLRAVD TGLYLCKVELMYPPPYFVGMGNGTQIYVIDP EPCPDSDFLWILVAVSLGLFFYSFLVSAVSL SKMLKKRSPLTTGVYVKMPPTPECEKQFQ PYFIPIN
86	CTLA-4 de rata (Q62859)	MACLGLQRYKTHLQLPSRTWPFVLLSLLFI PIFSEAIQVTQPSVVLASSHGVAFPCEYAS SHNTDEVVRVTVLRQTNDQVTEVCATTFTVK NTLGFLDDPFCSGTFNESRVNLTIQGLRAAD TGLYFCKVELMYPPPYFVGMGNGTQIYVIDP EPCPDSDFLWILAAVSSGLFFYSFLVTAVSL NRTLKKRSPLTTGVYVKMPPTPECEKQFQ PYFIPIN
87	CD28 humano (P10747)	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAY DNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSA VEVCVVYGNYSQQQLQVYSKTGFNCDGKLG NESVTFYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPY LDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPF WVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRS RLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPR DFAAYRS
88	ICOS humano (Q9Y6W8)	MKSGLWYFFLFCLRIKVLGTGEINGSANYEMF IFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGGQIL CDLTCTKSGSNTVSIKSLKFCHSLSNNSVS FFLYNLDHSHANYFCNLSIFDPPPFKVTLT GGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVCI LGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMR VNTAKKSRLTDVTL
89	BTLA humano (Q7Z6A9)	MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNHKG ESCDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKY CANRPHVTWCKLNGTTCVKLEDRTSWKE EKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSN LIESHSTTLVTDVKSASERPSKDEMASRP

		WLLYRLLPLGGLPLLITTCFCLFCCLRRHQG KQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTR QNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVY SNPCLEENKPGIVYASLNHHSVIGPNSRLARN VKEAPTEYASICVRS
90	PD-1 humano (Q15116)	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPD RPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT SESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQ PGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRND SGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTER AEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVGGLL GSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPL KEDPSAVPVFVSVDYGELDFQWREKTPEPPV PCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSAD GPRSAQPLRPEDGHCSWPL

[00102] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende:

(a) una CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos SYX₁MX₂ (SEQ ID N°: 22), en donde X₁ es S o A; y X₂ es N o S; y/o

(b) una CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID N°: 2); y/o

(c) una CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos VGLMGPFXI (SEQ ID N°: 23), en donde X es D o N; y/o

(d) una CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID N°: 24), en donde X₁ es S o G; X₂ es R, S o T; y X₃ es G o A; y/o

(e) una CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID N°: 25), en donde: X₁ es G o A; X₂ es A o T; y X₃ es T, S, R o N; y/o

(f) una CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos QQYGX₁SPX₂T (SEQ ID N°: 26), en donde: X₁ es S o T; y X₂ es W o F.

[00103] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una, dos o las tres CDR VH precedentes. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende la CDRH1 de uno de los anticuerpos de la Tabla 2. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende la CDRH2 de uno de los anticuerpos de la Tabla 2. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende la CDRH3 de uno de los anticuerpos de la Tabla 2. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una, dos o las tres CDR VH de uno de los anticuerpos de la Tabla 2 (por ejemplo, las CDR VH en una fila de la Tabla 2, por ejemplo, todas las CDR VH son del anticuerpo AGEN1884w). En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende los marcos de trabajo VH que se describen en la presente. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende las regiones de marco de trabajo VH de un anticuerpo ilustrado en la Tabla 4 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las regiones de marco de trabajo en una fila de la Tabla 4).

[00104] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una, dos o las tres CDR VL precedentes. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende la CDRL1 de uno de los anticuerpos de la Tabla 3. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende la CDRL2 de uno de los anticuerpos de la Tabla 3. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende la CDRL3 de uno de los anticuerpos de la Tabla 3. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una, dos o las tres CDR VL de uno de los anticuerpos de la Tabla 3 (por ejemplo, las CDR VL en una fila de la Tabla 3, por ejemplo, todas las CDR VL son del anticuerpo AGEN1884w). En determinadas formas

de realización, el anticuerpo comprende las regiones de marco de trabajo VL que se describen en la presente. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende las regiones de marco de trabajo (FR) VL de un anticuerpo ilustrado en la Tabla 5 (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro de las regiones de marco de trabajo en una fila de la Tabla 5).

[00105] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

(a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos SYX₁MX₂ (SEQ ID N°: 22), en donde

X₁ es S o A; y X₂ es N o S;

(b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID N°: 2);

(c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos VGLMGPFXI (SEQ ID N°: 23), en donde X es D o N;

(d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID N°: 24), en donde X₁ es S o G; X₂ es R, S o T; y X₃ es G o A;

(e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID N°: 25), en donde X₁ es G o A; X₂ es A o T; y X₃ es T, S, R o N; y

(f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYGX₁SPX₂T

(SEQ ID N°: 26), en donde X_1 es S o T; y X_2 es W o F.

[00106] En determinadas formas de realización, la CDRH1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 1 y 27. En determinadas formas de realización, la CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 3 y 28. En determinadas formas de realización, la CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 4, 29 y 30. En determinadas formas de realización, la CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 5 y 31-35. En determinadas formas de realización, la CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 6, 36 y 37. En determinadas formas de realización, las CDRH1, CDRH2 y CDRH3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente, de un anticuerpo de la Tabla 2. En determinadas formas de realización, las CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente, de un anticuerpo de la Tabla 3.

[00107] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, en donde las CDRH1, CDRH2 y CDRH3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente, ilustradas en las SEQ ID N°: 1, 2 y 3; 27, 2 y 3; o 27, 2 y 28.

[00108] En determinadas formas de realización, la presente

divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde las CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente, ilustradas en las SEQ ID N°: 4, 5 y 6; 29, 32 y 36; 29, 33 y 37; 30, 31 y 6; 29, 34 y 6; o 29, 35 y 37.

[00109] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente, ilustradas en las SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6; 1, 2, 3, 29, 32 y 36; 1, 2, 3, 29, 33 y 37; 27, 2, 3, 4, 5 y 6; 27, 2, 3, 29, 33 y 37; 1, 2, 3, 30, 31 y 6; 1, 2, 3, 29, 34 y 6; 1, 2, 3, 29, 35 y 37; 27, 2, 28, 4, 5 y 6; 27, 2, 28, 29, 32 y 36; 27, 2, 28, 29, 33 y 37; o 27, 2, 28, 29, 35 y 37, respectivamente.

[00110] En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las

secuencias de aminoácidos ilustradas en las SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

[00111] En determinadas formas de realización, las CDR de un anticuerpo se pueden determinar de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia, que se refiere a la ubicación de bucles estructurales de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, Chothia C & Lesk AM, (1987), *J Mol Biol* 196: 901-917; Al-Lazikani B *et al.*, (1997) *J Mol Biol* 273: 927-948; Chothia C *et al.*, (1992) *J Mol Biol* 227: 799-817; Tramontano A *et al.*, (1990) *J Mol Biol* 215(1): 175-82; y la Patente de los EE.UU. N°: 7.709.226). Típicamente, cuando se usa la convención de numeración de Kabat, el bucle de la CDRH1 de Chothia está presente en los aminoácidos 26 a 32, 33 ó 34 de la cadena pesada, el bucle de la CDRH2 de Chothia está presente en los aminoácidos 52 a 56 de la cadena pesada y el bucle de la CDRH3 de Chothia está presente en los aminoácidos 95 a 102 de la cadena pesada, en tanto el bucle de la CDRL1 de Chothia está presente en los aminoácidos 24 a 34 de la cadena liviana, el bucle de la CDRL2 de Chothia está presente en los aminoácidos 50 a 56 de la cadena liviana y el bucle de la CDRL3 de Chothia está presente en los aminoácidos 89 a 97 de la cadena liviana. El final del bucle de la CDRH1 de Chothia, cuando se numera usando la convención de numeración de Kabat, varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto es porque el esquema de numeración de Kabat ubica las inserciones en H35A y H35B; si ninguno de 35A o 35B está presente, el bucle termina en 32; si solamente está presente 35A, entonces el bucle termina en 33; si ambos 35A y 35B están presentes, el bucle termina en 34).

[00112] En determinadas formas de realización, la presente

divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, donde dicho anticuerpo comprende las CDR VL de Chothia de una VL de un anticuerpo divulgado en la presente en la Tabla 6 (por ejemplo, AGEN1884w o AGEN2041w). En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, donde dicho anticuerpo comprende las CDR VH de Chothia de un anticuerpo divulgado en la presente en la Tabla 6 (por ejemplo, AGEN1884w o AGEN2041w). En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, donde dicho anticuerpo comprende las CDR VH de Chothia y las CDR VL de Chothia de un anticuerpo divulgado en la presente en la Tabla 6 (por ejemplo, AGEN1884w o AGEN2041w). En determinadas formas de realización, los anticuerpos que se unen específicamente a la proteína CTLA-4 humano comprenden una o más CDR, en donde las CDR de Chothia y de Kabat tienen la misma secuencia de aminoácidos. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana y comprende combinaciones de las CDR de Kabat y las CDR de Chothia.

[00113] En determinadas formas de realización, las CDR de un anticuerpo se pueden determinar de acuerdo con el sistema de numeración IMGT que se describe en Lefranc M-P, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136 y Lefranc M-P *et al.*, (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212. De acuerdo con el esquema de numeración IMGT, la CDRH1 se encuentra en las posiciones 26 a 35, la CDRH2 se encuentra en las posiciones 51 a 57, la CDRH3 se encuentra

en las posiciones 93 a 102, la CDRL1 se encuentra en las posiciones 27 a 32, la CDRL2 se encuentra en las posiciones 50 a 52 y la CDRL3 se encuentra en las posiciones 89 a 97. En una forma de realización particular, la presente divulgación provee anticuerpos que se unen específicamente a la proteína CTLA-4 humana y comprenden las CDR de un anticuerpo divulgado en la presente en la Tabla 6 (por ejemplo, AGEN1884w o AGEN2041w) determinadas mediante el sistema de numeración IMGT, por ejemplo, como se describe en Lefranc M-P (1999) *supra* y Lefranc M-P *et al.*, (1999) *supra*.

[00114] En determinadas formas de realización, las CDR de un anticuerpo se pueden determinar de acuerdo con MacCallum RM *et al.*, (1996) *J Mol Biol* 262: 732-745. Véase también, por ejemplo, Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains", en *Antibody Engineering*, Kontermann y Dübel, eds., capítulo 31, páginas 422-439, Springer-Verlag, Berlín (2001). En una forma de realización particular, la presente divulgación provee anticuerpos que se unen específicamente a la proteína CTLA-4 humana y comprenden las CDR de un anticuerpo divulgado en la presente en la Tabla 6 (por ejemplo, AGEN1884w o AGEN2041w) determinadas mediante el método de MacCallum RM *et al.*

[00115] En determinadas formas de realización, las CDR de un anticuerpo se pueden determinar de acuerdo con el esquema de numeración AbM, que hace referencia a las regiones hipervariables AbM, que representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se emplean en el software de modelación de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.). En una forma de realización particular, la presente divulgación provee anticuerpos que se unen

específicamente a la proteína CTLA-4 humana y comprenden las CDR de un anticuerpo divulgado en la presente en la Tabla 6 (por ejemplo, AGEN1884w o AGEN2041w) determinadas mediante el esquema de numeración AbM.

[00116] Por lo tanto, en determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3 ilustradas en la SEQ ID N°: 7 y las secuencias de aminoácidos de las regiones CDRL1, CDRL2 y CDRL3 ilustradas en la SEQ ID N°: 8, en donde cada CDR se define de acuerdo con la definición de Kabat, la definición de Chothia, la combinación de la definición de Kabat y la definición de Chothia, el sistema de numeración IMGT, la definición de AbM o la definición de contacto de CDR.

[00117] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, donde dicho anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos ilustradas en las SEQ ID N°: 16, 17, 18, 19, 20 y 21, respectivamente.

[00118] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 72.

[00119] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de línea germinal de la IGHV3-21 humana. Es posible derivar una o más regiones seleccionadas entre el marco de trabajo 1, el marco de trabajo 2, el marco de trabajo 3, la CDRH1 y la CDRH2 (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco de estas regiones) a partir de una secuencia de línea germinal de la IGHV3-21 humana. En una forma de realización, el marco de trabajo 1, el marco de trabajo 2, el marco de trabajo 3, la CDRH1 y la CDRH2 derivan todos de una secuencia de línea germinal de la IGHV3-21 humana.

[00120] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95% o un 100% (por ejemplo, por lo menos un 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 7 y 38-42. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 7 y 38-42. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID N°: 7. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de

aminoácidos ilustrada en la SEQ ID N°: 12. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID N°: 93. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID N°: 14. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID N°: 94. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID N°: 76. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID N°: 97.

[00121] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 73.

[00122] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de línea germinal IGKV3-20 o IGKV3-11 humana. Es posible derivar una o más regiones seleccionadas entre el marco de trabajo 1, el marco de trabajo 2, el marco de trabajo 3, la CDRL1 y la CDRL2 (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco de estas regiones) a partir de una secuencia de línea germinal de la IGKV3-20 o la IGKV3-11 humana. En una forma de realización, el marco de trabajo 1, el marco de trabajo 2, el marco de trabajo 3, la CDRL1 y la CDRL2

derivan todos de una secuencia de línea germinal de la IGKV3-20 o la IGKV3-11 humana.

[00123] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95% o un 100% (por ejemplo, por lo menos un 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 8 y 43-47. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 8 y 43-47. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID N°: 8. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID N°: 13. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena liviana que tiene la secuencia de aminoácidos ilustrada en la SEQ ID N°: 15.

[00124] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de línea germinal de la IGHV3-21 humana y una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de

línea germinal IGKV3-20 o IGKV3-11 humana. Es posible derivar una o más regiones seleccionadas entre el marco de trabajo 1, el marco de trabajo 2, el marco de trabajo 3, la CDRH1 y la CDRH2 (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco de estas regiones) a partir de una secuencia de línea germinal de la IGHV3-21 humana. En una forma de realización, el marco de trabajo 1, el marco de trabajo 2, el marco de trabajo 3, la CDRH1 y la CDRH2 derivan todos de una secuencia de línea germinal de la IGHV3-21 humana. Es posible derivar una o más regiones seleccionadas entre el marco de trabajo 1, el marco de trabajo 2, el marco de trabajo 3, la CDRL1 y la CDRL2 (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco de estas regiones) a partir de una secuencia de línea germinal de la IGKV3-20 o la IGKV3-11 humana. En una forma de realización, el marco de trabajo 1, el marco de trabajo 2, el marco de trabajo 3, la CDRL1 y la CDRL2 derivan todos de una secuencia de línea germinal de la IGKV3-20 o la IGKV3-11 humana.

[00125] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95% o un 100% (por ejemplo, por lo menos un 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 7 y 38-42 y una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95% o un 100% (por ejemplo, por lo menos un 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%) idéntica a una secuencia de aminoácidos

seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 8 y 43-47. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID N°: 7 y 38-42 y una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 8 y 43-47. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena liviana ilustradas en las SEQ ID N°: 7 y 8; 7 y 44; 7 y 45; 38 y 8; 38 y 45; 39 y 43; 39 y 45; 39 y 46; 39 y 47; 40 y 43; 40 y 8; 40 y 44; 40 y 45; 41 y 8; 41 y 44; 41 y 45; 41 y 47; 42 y 43; o 42 y 45, respectivamente. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7; y una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 12; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 93; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13. En determinadas formas de realización, el anticuerpo

comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 94; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 76; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 97; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13.

[00126] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que compite de manera cruzada por la unión a la proteína CTLA-4 humana con un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de las cadenas pesada y liviana ilustradas en las SEQ ID N°: 7 y 8, respectivamente.

[00127] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un anticuerpo aislado que se une al mismo epítopo sobre la proteína CTLA-4 humana que un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de las cadenas pesada y liviana ilustradas en las SEQ ID N°: 7 y 8, respectivamente.

[00128] Se puede usar cualquier región Ig constante en los anticuerpos divulgados en la presente. En determinadas formas de realización, la región Ig es una región constante de la cadena pesada de la IgG₁ humana o de la IgG₂ humana.

[00129] En determinadas formas de realización, las regiones de IgG de los anticuerpos descritos en la presente tienen una mayor afinidad por

CD32B (también conocido como FcγRIIB o FCGR2B), por ejemplo, en comparación con un anticuerpo que tiene una región Fc de tipo salvaje, por ejemplo, una Fc de la IgG₁. En determinadas formas de realización, los anticuerpos que se describen en la presente tienen una afinidad selectivamente aumentada por CD32B (FcγRIIB) ante ambos CD32A (FcγRIIA) y CD16 (FcγRIIIA). Las alteraciones de secuencia que dan como resultado una afinidad aumentada por CD32B son conocidas en el arte, por ejemplo, en Mimoto *et al.*, *Protein Engineering, Design & Selection* 10: 589-598 (2013), Chu *et al.*, *Molecular Immunology* 45: 3926-3933 (2008) y Strohl, *Current Opinion in Biology* 20: 685-691 (2009), cada una de las cuales se incorpora por completo en la presente a modo de referencia. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de una IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en: G236D, P238D, S239D, S267E, L328F y L328E y combinaciones de las mismas, numeradas de acuerdo con el índice EU (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda (1991)). En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende las sustituciones S267E y L328F. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende las sustituciones P238D y L328E. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo,

una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende una sustitución P238D y una sustitución seleccionada del grupo que consiste en E233D, G237D, H268D, P271G, A330R y combinaciones de las mismas. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende las sustituciones P238D, E233D, G237D, H268D, P271G y A330R. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende G236D y S267E. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende S239D y S267E. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende V262E, S267E y L328F. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende V264E, S267E y L328F.

[00130] En determinadas formas de realización, las regiones de IgG de los anticuerpos descritos en la presente tienen una mayor afinidad por FcγRIIIA, por ejemplo, en comparación con un anticuerpo que tiene una región Fc de tipo salvaje, por ejemplo, una Fc de la IgG₁. Las alteraciones de secuencia que dan como resultado una afinidad aumentada por el FcγRIIIA son conocidas en el arte, por ejemplo, en Kellner *et al.*, *Methods* 65: 105-113 (2014), Lazar *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 103: 4005-4010 (2006), Shields *et al.*, *J*

Biol Chem., 276(9): 6591-6604 (2001), cada una de las cuales se incorpora por completo en la presente a modo de referencia. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en: G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305I, A330L, I332E, E333A, K334A, A339T y P396L y combinaciones de las mismas, numeradas de acuerdo con el índice EU (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda (1991)). En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende S239D. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende T256A. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende K290A. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende S298A. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende I332E. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento

de la misma, que comprende E333A. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende K334A. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende A339T. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende S239D e I332E. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende S239D, A330L e I332E. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende S298A, E333A y K334A. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende G236A, S239D y I332E. En determinadas formas de realización, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, una región constante de la IgG₁, o un fragmento de la misma, que comprende F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L.

[00131] En determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente presentan una actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). En determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente inician una depleción de células

mediada por células asesinas naturales. En determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente se usan para el tratamiento de tumores infiltrados con células asesinas naturales. En determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente presentan una actividad de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). En determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente inician una depleción de células mediada por macrófagos. En determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente se usan para el tratamiento de tumores infiltrados con macrófagos. En determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente deplecionan selectivamente las células T reguladoras intratumorales.

[00132] En determinadas formas de realización, un anticuerpo divulgado en la presente es un anticuerpo activable que en un estado activado se une a la proteína CTLA-4 humana. En determinadas formas de realización, el anticuerpo activable comprende una porción enmascaradora que inhibe la unión del anticuerpo en un estado no clivado a la proteína CTLA-4 humana y por lo menos una porción clivable acoplada al anticuerpo, por ejemplo, donde la porción clivable es un polipéptido que funciona como sustrato para una proteasa que está enriquecida en el microambiente tumoral. Los ejemplos de anticuerpo activables se describen, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. N°: 8.513.390 y 8.518.404 y las publicaciones de Solicitudes de Patente de los EE.UU. N°: US 2014/0255313, US 2014/0010810, US 2014/0023664, que se incorporan en la presente a modo de referencia. En determinadas formas de realización, el anticuerpo activable comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG humana que es una variante de una región constante

de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje, en donde la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana se une al FcγRIIIA humano con mayor afinidad que la región constante de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje se une al FcγRIIIA humano.

5.3 Composiciones farmacéuticas

[00133] En la presente se proveen composiciones que comprenden un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente que tienen el grado de pureza deseado en un vehículo, excipiente o estabilizante fisiológicamente aceptable (*Remington's Pharmaceutical Sciences* (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Los vehículos, excipientes o estabilizadores no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen soluciones amortiguadoras tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tal como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos que 10 residuos aproximadamente); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparaginas, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; azúcares tal como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tal como sodio; complejos de metales (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o agentes tensioactivos no iónicos tales como

TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

[00134] En una forma de realización específica, las composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente y opcionalmente uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización específica, las composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo descrito en la presente y opcionalmente uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el anticuerpo es el único ingrediente activo incluido en la composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente pueden ser de utilidad para inhibir la actividad de CTLA-4 y tratar una condición, tal como cáncer o una enfermedad infecciosa.

[00135] En un aspecto, en la presente se provee una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso como un medicamento.

[00136] En un aspecto, en la presente se provee una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer.

[00137] Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en las preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, soluciones amortiguadoras, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y

de dispersión, agentes emulsionantes, secuestrantes o agentes quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de vehículos acuoso incluyen cloruro de sodio para inyecciones, Ringer para inyecciones, dextrosa isotónica para inyecciones, agua estéril para inyecciones, dextrosa y Ringer lactato para inyecciones. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semillas de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de maní. Se deben agregar agentes antimicrobianos a concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a las preparaciones parenterales envasadas en contenedores de dosis múltiples e incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, metil y propil ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de benzetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro de sodio y dextrosa. Las soluciones amortiguadoras incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Los anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína. Los agentes de suspensión y dispersión incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulsionantes incluyen Polisorbato 80 (TWEEN® 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los vehículos farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajustar el pH.

[00138] La composición farmacéutica se puede formular para cualquier ruta de administración a un sujeto. Los ejemplos específicos de rutas de administración incluyen las vías intranasal, oral, pulmonar, transdérmica, intradérmica y parenteral. En la presente también se contempla una

administración parenteral, caracterizada por una inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa. Las preparaciones inyectables se pueden preparar en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para soluciones o suspensiones en líquidos antes de la inyección o como emulsiones. Los inyectables, las soluciones y las emulsiones también contienen uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se deseara, las composiciones farmacéuticas a administrar también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tal como agentes humectantes o emulsionantes, agentes reguladores del pH, estabilizantes, mejoradores de la solubilidad y otros agentes similares, tal como por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas.

[00139] Las preparaciones para una administración parenteral de un anticuerpo incluyen soluciones estériles listas para su inyección, productos solubles secos estériles, tal como polvos liofilizados, listos para su combinación con un solvente en el momento del uso, incluyendo tabletas hipodérmicas, suspensiones estériles listas para su inyección, productos insoluble secos estériles listos para su combinación con un vehículo en el momento del uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas.

[00140] Si se administran por vía intravenosa, los vehículos adecuados incluyen suero fisiológico o solución amortiguadora salina con fosfato (PBS) y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, como glucosa, polietilenglicol y polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

[00141] Las mezclas tópicas que comprenden un anticuerpo se

preparan como se describió para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsiones o semejantes y se puede formular como cremas, geles, ungüentos, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, aerosoles, supositorios, vendas, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para una administración tópica.

[00142] Un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente se puede formular como un aerosol para una aplicación tópica, tal como mediante inhalación (véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 4.044.126, 4.414.209 y 4.364.923, en las cuales se describen aerosoles para la administración de un esteroide de utilidad para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, en particular asma). Para una administración en el sistema respiratorio estas formulaciones se pueden encontrar en la forma de un aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para su insuflación, ya sea solo o en combinación con un vehículo inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación tendrán, en una forma de realización, diámetros menores que 50 micrones, en una forma de realización menores que 10 micrones.

[00143] Un anticuerpo anti-CRLA-4 descrito en la presente se puede formular para una aplicación local o tópica, tal como una aplicación tópica a la piel y las membranas mucosas, tal como sobre el ojo, bajo la forma de geles, cremas y lociones y para aplicar sobre el ojo o para aplicaciones intracistéricas intraespinales. La administración tópica se contempla para una administración transdérmica y también para su administración en los ojos o a mucosas o para terapias de inhalación. También se pueden administrar

soluciones nasales del anticuerpo, solo o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

[00144] Los parches transdérmicos, incluyendo dispositivos iontoforéticos y electroforéticos, son bien conocidos por los especialistas en el arte y se pueden usar para administrar un anticuerpo. Por ejemplo, dichos parches se divulgan en las Patentes de los EE.UU. N°: 6.267.983, 6.261.595, 6.256.533, 6,167,301, 6,024.975, 6,010,715, 5.985,317, 5.983,134, 5.948.433 y 5.860.957.

[00145] En determinadas formas de realización, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se describe en la presente es un polvo liofilizado, que se puede reconstituir para su administración como soluciones, emulsiones y otras mezclas. También se puede reconstituir y formular como sólidos o geles. El polvo liofilizado se prepara disolviendo un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se describe en la presente, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, en un solvente adecuado. En algunas formas de realización, el polvo liofilizado es estéril. El solvente puede contener un excipiente que mejore la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o de la solución reconstituida, preparada a partir del polvo. Los excipientes que se pueden usar incluyen, a modo de ejemplo, dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado. El solvente también puede contener una solución amortiguadora, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otra solución amortiguadora similar conocida por los especialistas en el arte, en una forma de realización, a un pH aproximadamente neutro. La posterior filtración estéril

de la solución seguido de liofilización bajo condiciones estándar conocidas por los especialistas en el arte provee la formulación deseada. En una forma de realización, la solución resultante se separará en porciones en viales para la liofilización. Cada vial va a contener una sola dosificación o múltiples dosificaciones del compuesto. El polvo liofilizado puede almacenarse en condiciones apropiadas, tales como de entre aproximadamente 4 °C y temperatura ambiente. La reconstitución de este polvo liofilizado con agua para inyecciones provee una formulación que se puede utilizar en una administración parenteral. Para la reconstitución, el polvo liofilizado se agrega a agua estéril u otro vehículo adecuado. La cantidad precisa depende del compuesto seleccionado. Dicha cantidad se puede determinar empíricamente.

[00146] Los anticuerpos anti-CTLA-4 que se describen en la presente y otras composiciones provistas en la presente también se pueden formular para dirigirlos a un tejido, receptor u otro área particular del cuerpo del sujeto a tratar. Muchos de dichos métodos de direccionamiento son bien conocidos por los especialistas en el arte. Todos dichos métodos de direccionamiento están contemplados en la presente para su uso en las composiciones de la presente. Por ejemplos no taxativos de métodos de direccionamiento, véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 6.316.652, 6.274.552, 6.271.359, 6.253.872, 6.139.865, 6.131.570, 6.120.751, 6.071.495, 6.060.082, 6.048.736, 6.039.975, 6.004.534, 5.985.307, 5.972.366, 5.900.252, 5.840.674, 5.759.542 y 5.709.874. En una forma de realización específica, un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se describe en la presente es direccionado a un tumor.

[00147] Las composiciones que se pueden usar para la

administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración, por ejemplo, a través de membranas de filtración estériles.

5.4 Métodos de uso

[00148] En otro aspecto, la presente divulgación provee un método de tratamiento de un sujeto que emplea los anticuerpos anti-CTLA-4 divulgados en la presente. Cualquier enfermedad o trastorno en un sujeto que pudiera verse beneficiado con la inhibición de la función del CTLA-4 puede ser tratado usando los anticuerpos anti-CTLA-4 divulgados en la presente. Los anticuerpos anti-CTLA-4 que se divulgan en la presente son de particular utilidad para inhibir la tolerancia del sistema inmunológico a tumores y por lo tanto se puede usar como una inmunoterapia para sujetos con cáncer. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un método para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto, donde dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica del mismo divulgada en la presente. En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un método de tratamiento de cáncer en un sujeto, donde dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o la composición farmacéutica, como se divulga en la presente. En determinadas formas de realización, el sujeto ha recibido con anterioridad una inmunoterapia. En determinadas formas de realización, el sujeto no ha recibido previamente ninguna inmunoterapia. En determinadas formas de realización, el cáncer es un cáncer avanzado o metastásico. Los cánceres que pueden ser tratados con los anticuerpos anti-CTLA-4 o las composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente incluyen, en un

sentido no taxativo, un cáncer sólido (por ejemplo, un cáncer sólido recidivante o refractario y un cáncer sólido avanzado o metastásico), carcinoma, sarcoma, melanoma (por ejemplo, un melanoma en etapa III o etapa IV), cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer urotelial, cáncer de ovario, cáncer de próstata (por ejemplo, cáncer de próstata metastásico refractario a hormonas y cáncer de próstata progresivo metastásico), cáncer de páncreas, cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama HER2+ (por ejemplo, cáncer de mama HER2+ recidivante/refractario)), cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello recidivante/refractario (HNSCC)), glioma, glioma maligno, glioblastoma multiforme, metástasis de cerebro, cáncer de Merkel, cáncer gástrico, cáncer gastroesofágico, carcinoma de células renales, melanoma uveal, cáncer de colon, cáncer cervical, linfoma (por ejemplo, linfoma recidivante o refractario), linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia y mieloma múltiple. En determinadas formas de realización, el cáncer es tratado mediante una administración intratumoral de los anticuerpos anti-CTLA-4 o las composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente. Los cánceres que pueden ser tratados con una administración intratumoral de los anticuerpos anti-CTLA-4 o las composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente incluyen, en un sentido no taxativo, tumores sólidos (por ejemplo, tumores sólidos avanzados o metastásicos), cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello recidivante/refractario (HNSCC)) y cáncer de mama (por ejemplo, cáncer de mama HER2+ (por ejemplo, cáncer de mama HER2+ recidivante/refractario)).

[00149] Los cánceres adicionales que pueden ser tratados con los

anticuerpos anti-CTLA-4 o las composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente incluyen, en un sentido no taxativo, linfomas de células B (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica de células B, linfoma no Hodgkin de células B, linfoma cutáneo de células B, linfoma difuso de células B grandes), carcinoma de células basales, cáncer de vejiga, blastoma, metástasis de cerebro, cáncer de mama, linfoma de Burkitt, carcinoma (por ejemplo, adenocarcinoma (por ejemplo, de la unión gastroesofágica)), cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer colorrectal (cáncer de colon y cáncer rectal), carcinoma de endometrio, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, linfoma folicular, cáncer gástrico, carcinoma de la unión gastroesofágica, cáncer gastrointestinal, glioblastoma (por ejemplo, glioblastoma multiforme, por ejemplo, recién diagnosticado o recurrente), glioma, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de de cabeza y cuello), metástasis hepática, enfermedad de Hodgkin y linfoma no Hodgkin, cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales y tumores de Wilms), cáncer de laringe, leucemia (por ejemplo, leucemia mielocítica crónica, leucemia de células pilosas), cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepático y hepatoma), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas), linfoma linfoblástica, linfoma, linfoma de células del manto, tumor de cerebro metastásico, cáncer metastásico, mieloma (por ejemplo, mieloma múltiple), neuroblastoma, melanoma ocular, cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas (por ejemplo, pancreatitis, adenocarcinoma ductal), cáncer de próstata (por ejemplo, refractario a hormonas (por ejemplo, resistente a la castración), metastásico, metastásico refractario a hormonas (por ejemplo,

resistente a la castración, independiente de andrógenos)), carcinoma de células renales (por ejemplo, metástasis), carcinoma de glándulas salivales, sarcoma (por ejemplo, rabdomiosarcoma), cáncer de piel (por ejemplo, melanoma (por ejemplo, melanoma metastásico)), sarcoma de tejidos blandos, tumores sólidos, carcinoma de células escamosas, sarcoma sinovial, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición (cáncer de células uroteliales), melanoma uveal (por ejemplo, metástasis), carcinoma verrugoso, cáncer de vulva y macroglobulinemia de Waldenstrom.

[00150] En algunas formas de realización, el cáncer tratado de acuerdo con los métodos que se describen en la presente es un sarcoma o carcinoma humano, por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales (por ejemplo, metástasis), hepatoma, carcinoma de conductos biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, neuroblastoma, cáncer cervical, tumor de testículo, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma

acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma o retinoblastoma. En determinadas formas de realización, el cáncer tratado de acuerdo con los métodos que se describen en la presente es una leucemia linfocítica aguda o una leucemia mieloide aguda (por ejemplo, mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (mielocítica crónica (granulocítica) leucemia o leucemia linfocítica crónica); enfermedad de Hodgkin; enfermedad no Hodgkin; leucemia mieloide aguda; linfoma de células B; linfoma de células T; linfoma anaplásico de células grandes; linfoma intraocular; linfoma folicular; linfoma del intestino delgado; o linfoma esplénico de la zona marginal. En determinadas formas de realización, el cáncer tratado de acuerdo con los métodos que se describen en la presente es mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada, tumores del estroma gastrointestinal, cáncer de cabeza y/o cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de la hipofaringe, carcinoma de células escamosas de la laringe, carcinoma de células de la orofaringe o carcinoma verrugoso de la laringe), sarcoma del estroma de endometrio, sarcoma de mastocitos, sarcoma de tejidos blandos en adultos, sarcoma uterino, carcinoma de células de Merkel, carcinoma urotelial, melanoma con metástasis de cerebro, melanoma uveal, melanoma uveal con metástasis en hígado, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer del recto o síndrome mielodisplásico. En algunas formas de realización, el cáncer tratado de acuerdo con los métodos es metastásico.

[00151] En determinadas formas de realización, el cáncer tratado de acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluye cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, melanoma,

cáncer bronquial, cáncer de vejiga, cáncer de cerebro o del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de útero o de endometrio, cáncer de la cavidad bucal o de faringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer del tracto biliar, cáncer de intestino delgado o apéndice, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de las glándulas suprarrenales, cáncer de células escamosas, mesotelioma, osteocarcinoma, tioma/carcinoma tímico, glioblastoma, síndrome mielodisplásico, sarcoma de tejidos blandos, DIPG, adenocarcinoma, osteosarcoma, condrosarcoma, leucemia o cáncer de páncreas. En algunas formas de realización, el cáncer tratado de acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluye un carcinoma (por ejemplo, an adenocarcinoma), linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma o leucemia. En determinadas formas de realización, el cáncer tratado de acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluye cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de páncreas, glioblastoma, glioma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepático y hepatoma), cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de mama inflamatorio, carcinoma de células de Merkel, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer de vejiga urinaria, carcinoma de endometrio, mieloma (por ejemplo, mieloma múltiple), carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales y tumores de Wilms), carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer de testículo, cáncer de esófago, adenocarcinoma seroso o

varios tipos de cáncer de cabeza y cuello. En determinadas formas de realización, el cáncer tratado de acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluye melanoma desmoplásico, cáncer de mama inflamatorio, timoma, cáncer rectal, cáncer anal o tratable quirúrgicamente o glioma del tronco encefálico no tratable quirúrgicamente. En una forma de realización específica, el cáncer es un tumor sólido. En otra forma de realización específica, el cáncer es un glioblastoma multiforme. En algunas formas de realización, el glioblastoma multiforme es recurrente. En algunas formas de realización, el glioblastoma multiforme fue diagnosticado recientemente. En algunas formas de realización, el glioblastoma multiforme es en un sujeto que tiene promotores MGMT no metilados. En algunas formas de realización, el glioblastoma multiforme es refractario a una terapia con Bevacizumab. En algunas formas de realización, el glioblastoma multiforme es en un sujeto que no ha recibido una terapia con Bevacizumab.

[00152] En algunas formas de realización, el cáncer tratado de acuerdo con los métodos que se describen en la presente es melanoma metastásico (por ejemplo, melanoma resistente metastásico), cáncer de ovario metastásico o carcinoma de células renales metastásico. En determinadas formas de realización, el cáncer tratado de acuerdo con los métodos que se describen en la presente es un melanoma que es resistente a Ipilimumab. En algunas formas de realización, el cáncer tratado de acuerdo con los métodos que se describen en la presente es un melanoma que es resistente a Nivolumab o Pembrolizumab. En algunas formas de realización, el cáncer tratado de acuerdo con los métodos que se describen en la presente es un melanoma que es resistente a Ipilimumab y Nivolumab o Pembrolizumab.

[00153] En determinadas formas de realización, la presente divulgación provee un método para prevenir o tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto, donde dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica con el mismo, según se divulga en la presente. En una forma de realización, en la presente se proveen métodos para prevenir y/o tratar una infección (por ejemplo, una infección viral, una infección bacteriana, una infección fúngica, una infección por protozoos o una infección por parásitos). La infección prevenida y/o tratada de acuerdo con los métodos puede ser causada por un agente infeccioso identificado en la presente. En una forma de realización específica, un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente o una composición con el mismo es el único agente activo administrado a un sujeto. En algunas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente o una composición con el mismo se usa en combinación con intervenciones antiinfecciosas (por ejemplo, antivirales, antibacterianos, antifúngicos o antihelmínticos) para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

[00154] Las enfermedades infecciosas que se pueden tratar y/o prevenir con los anticuerpos anti-CTLA-4 o las composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente son causadas por agentes infecciosos que incluyen, pero en un sentido no taxativo, bacterias, parásitos, hongos, protozoos y virus. En una forma de realización específica, la enfermedad infecciosa tratada y/o prevenida mediante los anticuerpos anti-CTLA-4 o las composiciones farmacéuticas que se divulgan en la presente es causada por un virus. Las enfermedades virales o infecciones virales que se pueden

prevenir y/o tratar de acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, las que son causadas por hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza (por ejemplo, influenza A o influenza B), varicela, adenovirus, Herpes simplex tipo I (HSV-I), Herpes simplex tipo II (HSV-II), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus del sincicio respiratorio, virus del papiloma, virus de papova, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, virus coxsackie, virus de paperas, virus de sarampión, virus de rubeola, virus del polio, viruela, virus de Epstein Barr, virus de inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-I), virus de inmunodeficiencia humana tipo II (HIV-II) y agentes de enfermedades virales tales como meningitis viral, encefalitis, dengue o viruela.

[00155] Las infecciones bacterianas que se pueden prevenir y/o tratar incluyen infecciones causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las enfermedades bacterianas causadas por bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* y *Pseudomonas aeruginosa*) que se pueden prevenir y/o tratar de acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, *Mycobacteria rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Bacillus anthracis* (antrax), tétano, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *mycobacterium*, pertissus, cólera, plaga, difteria, *Chlamydia*, *S. aureus* y *Legionella*.

[00156] Las enfermedades por protozoos o las infecciones por protozoos causadas por protozoos que se pueden prevenir y/o tratar de

acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, leishmaniasis, coccidiosis, tripanosomiasis, esquistosomiasis o malaria. Las enfermedades por parásitos o las infecciones por parásitos causadas por parásitos que se pueden prevenir y/o tratar de acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, Clamidia y Ricketsia.

[00157] Las enfermedades por hongos o las infecciones por hongos que se pueden prevenir y/o tratar de acuerdo con los métodos que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, aquellas causadas por infecciones con *Candida*, zigomycosis, mastitis por *Candida*, tricosporonosis diseminada progresiva con tricosporonemia latente, candidiasis diseminada, paracoccidioidomicosis pulmonar, aspergilosis pulmonar, neumonía por *Pneumocystis carinii*, meningitis criptocócica, meningoencefalitis coccidioide y vasculitis cefalorraquídeo, infección por *Aspergillus niger*, queratitis por *Fusarium*, micosis de los senos paranasales, endocarditis por *Aspergillus fumigatus*, discondroplasia tibial, vaginitis por *Candida glabrata*, candidiasis orofaríngea, enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X, tiña del pie, candidiasis cutánea, placentitis micótico, tricosporonosis diseminada, aspergilosis broncopulmonar alérgica, queratitis micótica, infección por *Cryptococcus neoformans*, peritonitis fúngica, infección geniculata *Curvularia*, endoftalmitis por estafilococos, esporotricosis y dermatofitosis.

[00158] En determinadas formas de realización, la enfermedad infecciosa es aguda. En determinadas formas de realización, la enfermedad infecciosa es crónica. En determinadas formas de realización, la enfermedad

infecciosa es causada por un flavivirus, por ejemplo, virus del Nilo Occidental, encefalitis de San Luis, virus Powassan, virus de la encefalitis por garrapatas, virus del dengue, virus Zika, virus de la enfermedad de Kyasanur Forest, virus de la fiebre amarilla y el virus Chikungunya. En determinadas formas de realización, la enfermedad infecciosa es causada por el virus del Ebola. En determinadas formas de realización, la enfermedad infecciosa es causada por el virus de la influenza. En determinadas formas de realización, la enfermedad infecciosa es causada por el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus de la Hepatitis B (HBV) o virus de la Hepatitis C (HCV). En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica con el mismo, según se divulga en la presente, promueve el control viral. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica con el mismo, según se divulga en la presente, eliminates los reservorios virales.

[00159] La presente invención se relaciona, en un aspecto, con un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso como un medicamento.

[00160] La presente invención se relaciona, en un aspecto, con un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención, y/o su uso en combinación con vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables, para preparar composiciones farmacéuticas o medicamentos para una inmunoterapia (por ejemplo, una inmunoterapia para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto, para tratar cáncer o para tratar o prevenir

enfermedades infecciosas).

[00161] La presente invención se relaciona, en un aspecto, con un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer.

[00162] La presente invención se relaciona, en un aspecto, con un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método para inhibir la tolerancia del sistema inmunológico a tumores y/o para una inmunoterapia para sujetos con cáncer.

[00163] La presente invención se relaciona, en un aspecto, con un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad infecciosa.

[00164] En determinadas formas de realización, estos métodos comprenden además administrar un agente terapéutico adicional al sujeto. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente de direccionamiento a un punto de control. En determinadas formas de realización, el agente de direccionamiento a un punto de control se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo anti-PD-1 antagonista, un anticuerpo anti-PD-L1 antagonista, un anticuerpo anti-CD27 antagonista, un anticuerpo anti-CTLA-4 antagonista, un anticuerpo

anti-TIM-3 antagonista, un anticuerpo anti-LAG-3 antagonista, un anticuerpo anti-CEACAM1 antagonista, un anticuerpo anti-GITR agonista, un anticuerpo anti-OX40 agonista y un anticuerpo anti-CD137 agonista, un anticuerpo anti-DR3 agonista, un anticuerpo anti-TNFSF14 agonista y un anticuerpo anti-CD27 agonista. En determinadas formas de realización, el agente de direccionamiento a un punto de control es un anticuerpo anti-PD-1 antagonista. En determinadas formas de realización, el agente de direccionamiento a un punto de control es un anticuerpo anti-PD-L1 antagonista. En determinadas formas de realización, el agente de direccionamiento a un punto de control es un anticuerpo anti-LAG-3 antagonista. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un agonista de un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral o de un miembro de la superfamilia de factores de necrosis tumoral.

[00165] En determinadas formas de realización, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y (b) un agente terapéutico adicional, para su uso como un medicamento. En una forma de realización preferida, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente de direccionamiento a un punto de control.

[00166] En determinadas formas de realización, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente

aceptable y (b) un agente terapéutico adicional, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer.

[00167] En determinadas formas de realización, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y (b) un agente terapéutico adicional, para su uso en un método para el tratamiento de una enfermedad infecciosa.

[00168] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con un compuesto dirigido contra una o más enzimas inmunomoduladoras, tal como IDO (indolamina-(2,3)-dioxigenasa) y/o TDO (triptofano 2,3-dioxigenasa). En determinadas formas de realización, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en epacadostat (Incyte Corp; véase, por ejemplo, WO 2010/005958 que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia), F001287 (Flexus Biosciences), indoximod (NewLink Genetics) y NLG919 (NewLink Genetics). En una forma de realización, el compuesto es epacadostat. En otra forma de realización, el compuesto es F001287. En otra forma de realización, el compuesto es indoximod. En otra forma de realización, el compuesto es NLG919.

[00169] En determinadas formas de realización, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y (b) un compuesto dirigido contra una enzima inmunomoduladora,

para su uso como un medicamento. En una forma de realización preferida, el compuesto está dirigido contra IDO y/o TDO.

[00170] En determinadas formas de realización, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y (b) un compuesto dirigido contra una enzima inmunomoduladora, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer. En una forma de realización preferida, el compuesto está dirigido contra IDO y/o TDO.

[00171] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con una vacuna. En determinadas formas de realización, la vacuna es una vacuna antitumoral basada en una proteína de shock de calor o una vacuna con patógenos basada en una proteína de shock de calor. En una forma de realización específica, un anticuerpo anti-CTLA-4 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con una vacuna antitumoral basada en una proteína de shock de calor. Las proteínas de shock de calor (HSP) constituyen una familia de proteínas altamente conservadas que son ubicuas para todas las especies. Su expresión se puede inducir fuertemente a niveles mucho más altos como resultado de un shock de calor u otras formas de estrés, incluyendo exposición a toxinas, estrés oxidativo o deprivación de glucosa. Se han clasificado en cinco familias de acuerdo con el peso molecular: HSP-110, -90, -70, -60 y -28. Las HSP suministran péptidos inmunogénicos por la vía de presentación cruzada en las células presentadoras de antígenos (APC), tales como macrófagos y células dendríticas (DCs), lo cual

conduce a la activación de células T. Las HSP funcionan como vehículos chaperones de complejos formadores de péptidos antigénicos asociados a tumores capaces de inducir una inmunidad específica de tumores. Luego de su liberación de las células tumorales moribundas, los complejos de HSP-antígeno son captados por las células presentadoras de antígenos (APC) en donde los antígenos son procesados en péptidos que se unen a moléculas de MHC clase I y clase II lo cual conduce a la activación de células T CD8+ y CD4+ anti-tumorales. La inmunidad generada por los complejos de HSP derivados de preparaciones de tumores está dirigida específicamente contra el único repertorio de péptidos antigénicos expresado por el cáncer de cada sujeto.

[00172] Un complejo de proteína-péptido de shock de calor (HSPPC) es un complejo de proteína-péptido que consiste en una proteína de shock de calor complejada de manera no covalente con péptidos antigénicos. Los HSPPC generan respuestas inmunológicas tanto innatas como adaptativas. En una forma de realización específica, el o los péptidos antigénicos presentan antigenicidad para el cáncer bajo tratamiento. Los HSPPC son tomados eficazmente por las APC a través de los receptores de membrana (fundamentalmente CD91) o mediante unión a receptores tipo Toll. La internalización del HSPPC da como resultado una maduración funcional de las APC con producción de quimioquinas y citoquinas lo cual conduce a la activación de células asesinas naturales (NK), monocitos y respuestas inmunológicas mediadas por Th1 y Th-2. En determinadas formas de realización, los HSPPC usadas en los métodos divulgados en la presente comprenden una o más proteínas de shock de calor de la familia hsp60, hsp70

o hsp90 de proteínas de estrés formando complejos con péptidos antigénicos. En determinadas formas de realización, los HSPPC comprenden hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, gp96, calreticulina o combinaciones de dos o más de los mismos.

[00173] En una forma de realización específica, un anticuerpo anti-CTLA-4 divulgado en la presente se administra a un sujeto en combinación con un complejo de proteína-péptido de shock de calor (HSPPC), por ejemplo, un complejo de proteína-péptido de shock de calor-96 (HSPPC-96), para el tratamiento de cáncer. El HSPPC-96 comprende una proteína de shock de calor (Hsp) de 96 kD, gp96, complejada con péptidos antigénicos. El HSPPC-96 es una inmunoterapia contra el cáncer elaborada a partir del tumor de un sujeto y contiene la “huella digital” antigénica del cáncer. En determinadas formas de realización, esta huella digital contiene antígenos únicos que solamente están presentes en las células cancerosas específicas de dicho sujeto particular y la inyección de la vacuna pretende estimular el sistema inmunológico del sujeto para reconocer y atacar cualquier célula con esta huella digital cancerosa específica.

[00174] En determinadas formas de realización, el HSPPC, por ejemplo, el HSPPC-96, es producido a partir de tejido tumoral de un sujeto. En una forma de realización específica, el HSPPC (por ejemplo, HSPPC-96) se produce a partir de un tumor del tipo de cáncer, o una metástasis del mismo, bajo tratamiento. En otra forma de realización específica, el HSPPC (por ejemplo, HSPPC-96) es autólogo para el sujeto bajo tratamiento. En determinadas formas de realización, el tejido tumoral es un tejido tumoral no necrótico. En determinadas formas de realización, se usa por lo menos 1

gramo (por ejemplo, por lo menos 1, por lo menos 2, por lo menos 3, por lo menos 4, por lo menos 5, por lo menos 6, por lo menos 7, por lo menos 8, por lo menos 9 o por lo menos 10 gramos) de tejido tumoral no necrótico para producir un régimen de vacuna. En determinadas formas de realización, después de una resección quirúrgica, se congela el tejido tumoral no necrótico antes de su uso en la preparación de vacunas. En algunas formas de realización, el HSPPC, por ejemplo, HSPPC-96, se aísla a partir del tejido tumoral mediante técnicas de purificación, se filtra y se prepara para una vacuna inyectable. En determinadas formas de realización, al sujeto se le administran 6-12 dosis del HSPPC, por ejemplo, HSPCC-96. En dichas formas de realización, las dosis de HSPPC, por ejemplo, HSPPC-96, se pueden administrar semanalmente para las primeras 4 dosis y luego cada dos semanas para 2-8 dosis adicionales.

[00175] Otros ejemplos de HSPPC que se pueden usar de acuerdo con los métodos que se describen en la presente se divulgan en las siguientes patentes y solicitudes de patente, que se incorporan por completo a modo de referencia en la presente, las Patentes de los EE.UU. N°: 6,391,306, 6,383.492, 6.403,095, 6.410,026, 6.436.404, 6.447.780, 6.447.781 y 6.610.659.

[00176] En determinadas formas de realización, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y (b) una vacuna, para su uso como un medicamento. En una forma de realización preferida, la vacuna es una vacuna antitumoral basada en una proteína de shock de calor o una vacuna con patógenos basada en una

proteína de shock de calor. En una forma de realización preferida, la vacuna es una vacuna viral basada en una proteína de shock de calor.

[00177] En determinadas formas de realización, la presente invención se relaciona con (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y (b) una vacuna, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer. En una forma de realización preferida, la vacuna es una vacuna tumoral basada en una proteína de shock de calor.

[00178] El anticuerpo anti-CTLA-4 y el agente terapéutico adicional (por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un agente de direccionamiento a un punto de control, un inhibidor de IDO y/o una vacuna) se puede administrar separadamente, sucesivamente o de manera concurrente como formas de dosificación separadas. En una forma de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 se administra por vía parenteral y un inhibidor de IDO se administra por vía oral.

[00179] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 divulgado en la presente se administra a un sujeto por vía intratumoral. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 divulgado en la presente se administra a un sujeto por vía intratumoral en combinación con un agente terapéutico adicional. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional se administra por vía sistémica. En determinadas formas de realización, el sujeto tiene tumores sólidos. En determinadas formas de realización, el sujeto tiene carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). En determinadas formas de realización, el sujeto tiene cáncer

de mama HER2+. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional que se administra por vía sistémica es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, pembrolizumab o nivolumab). En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional que se administra por vía sistémica es un anticuerpo anti-EGFR (por ejemplo, cetuximab). En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional que se administra por vía sistémica es un anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo, trastuzumab). En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional que se administra por vía sistémica es un agente quimioterapéutico (por ejemplo, gemcitabine). En determinadas formas de realización, el sujeto tiene tumores sólidos y el agente terapéutico adicional que se administra por vía sistémica es un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, pembrolizumab o nivolumab). En determinadas formas de realización, el sujeto tiene carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) y el agente terapéutico adicional que se administra por vía sistémica es un anticuerpo anti-EGFR (por ejemplo, cetuximab). En determinadas formas de realización, el sujeto tiene cáncer de mama HER2+ y el agente terapéutico adicional que se administra por vía sistémica es un anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo, trastuzumab). En determinadas formas de realización, al sujeto también se le administró un agente quimioterapéutico (por ejemplo, gemcitabine). En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o una composición farmacéutica de la presente invención y opcionalmente un agente terapéutico adicional, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer, en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 y/o la composición farmacéutica de la presente invención se administran por vía intratumoral al sujeto. En una forma

de realización preferida, se administra un agente terapéutico adicional al sujeto, más preferiblemente, el agente terapéutico adicional se administra por vía sistémica al sujeto.

[00180] En determinadas formas de realización, se usa un anticuerpo anti-PD-1 en los métodos divulgados en la presente. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es Nivolumab, también conocido como BMS-936558 o MDX1106, desarrollado por Bristol-Myers Squibb. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es Pembrolizumab, también conocido como Lambrolizumab o MK-3475, desarrollado por Merck & Co. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es Pidilizumab, también conocido como CT-011, desarrollado por CureTech. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es MEDI0680, también conocido como AMP-514, desarrollado por Medimmune. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es PDR001, desarrollado por Novartis Pharmaceuticals. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es REGN2810 desarrollado por Regeneron Pharmaceuticals. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es PF-06801591 desarrollado por Pfizer. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es BGB-A317 desarrollado por BeiGene. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es TSR-042 desarrollado por AnaptysBio y Tesaro. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-1 es SHR-1210 desarrollado por Hengrui.

[00181] Otros ejemplos no taxativos de anticuerpos anti-PD-1 que se pueden usar en los métodos de tratamiento divulgados en la presente se

divulgan en las siguientes patentes y solicitudes de patente, que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia para todo fin: Patente de los EE.UU. N°: 6.808.710; Patente de los EE.UU. N°: 7.332.582; Patente de los EE.UU. N°: 7.488.802; Patente de los EE.UU. N°: 8.008.449; Patente de los EE.UU. N°: 8.114.845; Patente de los EE.UU. N°: 8.168.757; Patente de los EE.UU. N°: 8.354.509; Patente de los EE.UU. N°: 8.686.119; Patente de los EE.UU. N°: 8.735.553; Patente de los EE.UU. N°: 8.747.847; Patente de los EE.UU. N°: 8.779.105; Patente de los EE.UU. N°: 8.927.697; Patente de los EE.UU. N°: 8.993.731; Patente de los EE.UU. N°: 9.102.727; Patente de los EE.UU. N°: 9.205.148; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2013/0202623 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2013/0291136 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2014/0044738 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2014/0356363 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2016/0075783 A1; y publicación PCT N°: WO 2013/033091 A1; publicación PCT N°: WO 2015/036394 A1; publicación PCT N°: WO 2014/179664 A2; publicación PCT N°: WO 2014/209804 A1; publicación PCT N°: WO 2014/206107 A1; publicación PCT N°: WO 2015/058573 A1; publicación PCT N°: WO 2015/085847 A1; publicación PCT N°: WO 2015/200119 A1; publicación PCT N°: WO 2016/015685 A1; y publicación PCT N°: WO 2016/020856 A1.

[00182] En determinadas formas de realización, se usa un anticuerpo anti-PD-L1 se usa en los métodos divulgados en la presente. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es atezolizumab desarrollado por Genentech. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es durvalumab desarrollado por AstraZeneca, Celgene y

Medimmune. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es avelumab, también conocido como MSB0010718C, desarrollado por Merck Serono y Pfizer. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105 desarrollado por Bristol-Myers Squibb. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-PD-L1 es AMP-224 desarrollado por Amplimmune y GSK.

[00183] Los ejemplos no taxativos de anticuerpos anti-PD-L1 que se pueden usar en los métodos de tratamiento divulgados en la presente se divulgan en las siguientes patentes y solicitudes de patente, que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia para todo fin: Patente de los EE.UU. N°: 7.943.743; Patente de los EE.UU. N°: 8.168.179; Patente de los EE.UU. N°: 8.217.149; Patente de los EE.UU. N°: 8.552.154; Patente de los EE.UU. N°: 8.779.108; Patente de los EE.UU. N°: 8.981.063; Patente de los EE.UU. N°: 9.175.082; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2010/0203056 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2003/0232323 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2013/0323249 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2014/0341917 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2014/0044738 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2015/0203580 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2015/0225483 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2015/0346208 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2015/0355184 A1; y publicación PCT N°: WO 2014/100079 A1; publicación PCT N°: WO 2014/022758 A1; publicación PCT N°: WO 2014/055897 A2; publicación PCT N°: WO 2015/061668 A1; publicación PCT N°: WO 2015/109124 A1; publicación PCT N°: WO 2015/195163 A1; publicación PCT N°: WO

2016/000619 A1; y publicación PCT N°: WO 2016/030350 A1.

[00184] En determinadas formas de realización, se usa un anticuerpo anti-LAG-3 en los métodos divulgados en la presente. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-LAG-3 es BMS-986016 desarrollado por Bristol-Myers Squibb. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-LAG-3 es LAG525 desarrollado por Novartis. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-LAG-3 es GSK2831781 desarrollado por GSK.

[00185] Los ejemplos no taxativos de anticuerpos anti-LAG-3 que se pueden usar en los métodos de tratamiento divulgados en la presente se divulgan en las siguientes patentes y solicitudes de patente, que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia para todo fin: Patente de los EE.UU. N°: 9.244.059; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2011/0150892 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2014/0093511 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2014/0286935 A1; publicación de Patente de los EE.UU. N°: US 2015/0259420 A1; y publicación PCT N°: WO 2015/042246 A1; publicación PCT N°: WO 2015/116539 A1; publicación PCT N°: WO 2015/200119 A1; y publicación PCT N°: WO 2016/028672 A1.

[00186] En determinadas formas de realización, se usa un anticuerpo anti-EGFR en los métodos divulgados en la presente. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-EGFR es cetuximab desarrollado por Bristol-Myers Squibb y ImClone, panitumumab desarrollado por Abgenix y Amgen, nimotuzumab desarrollado por CMI Cuba y YM BioSciences, necitumumab desarrollado por ImClone, zalutumumab

desarrollado por Genmab, matuzumab desarrollado por Takeda, Sym004 desarrollado por Merck Serono y Symphogen, imgatuzumab desarrollado por Glycart y Roche, duligotumab desarrollado por Genentech y Roche, depatuxizumab desarrollado por Abbott, depatuxizumab mafodotin desarrollado por Abbvie, MM-151 desarrollado por Adimab y Merrimack, GC1118 desarrollado por Green Cross, AMG 595 desarrollado por Amgen y ImmunoGen, CetuGEX desarrollado por Glycotope, laprituximab emtansine desarrollado por ImmunoGen, JNJ-61186372 desarrollado por Genmab y Janssen Biotech, SCT200 desarrollado por Sinocelltech, LY3164530 desarrollado por Lilly, HLX07 desarrollado por Shanghai Henlius o SYN004 desarrollado por Synermore.

[00187] En determinadas formas de realización, se usa un anticuerpo anti-HER2 en los métodos divulgados en la presente. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-HER2 es trastuzumab desarrollado por Genentech y Roche, trastuzumab emtansine desarrollado por Genentech y Roche, pertuzumab desarrollado por Genentech, ertumaxomab desarrollado por Fresenius, margetuximab desarrollado por MacroGenics, MM-111 desarrollado por Merrimack, CT-P06 desarrollado por Celltrion, PF-05280014 desarrollado por Pfizer, MM-302 desarrollado por Merrimack, SB3 desarrollado por Merck & Co, CMAB302 desarrollado por Shanghai CP Guojian, TrasGEX desarrollado por Glycotope, ARX788 desarrollado por Ambrx y Zhejiang Medicine, SYD985 desarrollado por Synthon, FS102 desarrollado por Bristol-Myers Squibb y f-star, BCD-022 desarrollado por Biocad, ABP 980 desarrollado por Amgen, DS-8201a desarrollado por Daiichi Sankyo, HLX02 desarrollado por Shanghai Henlius o CANMAb desarrollado por Biocon y

Mylan.

[00188] Un anticuerpo o una composición farmacéutica que se describe en la presente se puede suministrar a un sujeto por una variedad de rutas. Estas incluyen, pero en un sentido no taxativo, las rutas parenteral, intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, tópica, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, intravenosa, intratumoral, conjuntiva y subcutánea. También se puede emplear una administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y la formulación con un agente aerosolizante para su uso como un aerosol. En determinadas formas de realización, el anticuerpo o la composición farmacéutica que se describe en la presente se suministra por vía subcutánea o intravenosa. En determinadas formas de realización, el anticuerpo o la composición farmacéutica que se describe en la presente se suministra por vía intratumoral. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se suministra en un nódulo linfático de drenaje tumoral. En determinadas formas de realización, el anticuerpo o la composición farmacéutica que se describe en la presente se suministra mediante una administración localizada (por ejemplo, una administración subcutánea). En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se suministra por vía sistémica. En determinadas formas de realización, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica divulgada en la presente se suministra por vía local.

[00189] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o una composición farmacéutica de la presente

invención y opcionalmente un agente terapéutico adicional, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer, en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 y/o la composición farmacéutica de la presente invención se suministra por vía intratumoral al sujeto, se suministra en un nódulo linfático de drenaje tumoral de un sujeto o se suministra mediante una administración localizada (por ejemplo, una administración subcutánea) a un sujeto.

[00190] La cantidad de anticuerpo o composición que será eficaz en el tratamiento y/o la prevención de una condición dependerá de la naturaleza de la enfermedad y se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar.

[00191] La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la ruta de administración y la severidad de la infección o enfermedad causada por el mismo, y se deberá decidir de acuerdo con el buen juicio del especialista y las circunstancias de cada paciente. Por ejemplo, las dosis eficaces también pueden variar dependiendo de los medios de administración, el sitio blanco, el estado fisiológico del paciente (incluyendo edad, peso corporal y estado de salud), de si el paciente es un ser humano o un animal, otras medicaciones administradas o si tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos incluyendo mamíferos transgénicos. Las dosificaciones de tratamiento se titulan óptimamente para optimizar la seguridad y la eficacia.

[00192] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto (por ejemplo, mediante inyección intravenosa) a razón

de 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto (por ejemplo, mediante inyección intravenosa) cada tres semanas a las dosis que se describieron previamente.

[00193] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o una composición farmacéutica de la presente invención y opcionalmente un agente terapéutico adicional, para su uso en un método para el tratamiento de cáncer, en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 y/o la composición farmacéutica de la presente invención se administra a un sujeto a razón de 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg, más preferiblemente cada tres semanas.

[00194] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto (por ejemplo, mediante inyección intravenosa) a razón de 0,1 mg/kg o aproximadamente 0,1 mg/kg cada tres semanas. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto (por ejemplo, mediante inyección intravenosa) a razón de 0,3 mg/kg o aproximadamente 0,3 mg/kg cada tres semanas. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se

describe en la presente se administra a un sujeto (por ejemplo, mediante inyección intravenosa) a razón de 1 mg/kg o aproximadamente 1 mg/kg cada tres semanas. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto (por ejemplo, mediante inyección intravenosa) a razón de 3 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg cada tres semanas. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto (por ejemplo, mediante inyección intravenosa) a razón de 6 mg/kg o aproximadamente 6 mg/kg cada tres semanas. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto (por ejemplo, mediante inyección intravenosa) a razón de 10 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg cada tres semanas.

[00195] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto mediante inyección intratumoral a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto mediante inyección intratumoral cada tres semanas a las dosis descritas precedentemente.

[00196] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-

CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto mediante inyección intratumoral a razón de 0,01 mg/kg o aproximadamente 0,01 mg/kg cada tres semanas. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto mediante inyección intratumoral a razón de 0,03 mg/kg o aproximadamente 0,03 mg/kg cada tres semanas. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto mediante inyección intratumoral a razón de 0,1 mg/kg o aproximadamente 0,1 mg/kg cada tres semanas. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto mediante inyección intratumoral a razón de 0,3 mg/kg o aproximadamente 0,3 mg/kg cada tres semanas. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto mediante inyección intratumoral a razón de 1 mg/kg o aproximadamente 1 mg/kg cada tres semanas. En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto mediante inyección intratumoral a razón de 3 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg cada tres semanas.

[00197] En determinadas formas de realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica que se describe en la presente se administra a un sujeto mediante una administración localizada (por ejemplo, una administración subcutánea) a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg,

0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg.

[00198] Un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente también se puede usar para evaluar los niveles de la proteína CTLA-4 en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por los especialistas en el arte, incluyendo inmunoensayos, tales como un ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), inmunoprecipitación o transferencia Western. Las marcas para pruebas con anticuerpos adecuadas son conocidas en el arte e incluyen marcas de enzimas, tal como la glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{121}In) y tecnecio (^{99}Tc); marcas luminiscentes, tal como luminol; y marcas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina. Dichas marcas se pueden usar para marcar un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se describe en la presente. Como alternativa, se puede marcar un segundo anticuerpo que reconoce un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión al antígeno del mismo descrito en la presente y se puede usar en combinación con un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para detectar los niveles de la proteína CTLA-4. En una forma de realización, la presente invención se relaciona con el uso de un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención, para evaluar y/o detectar los niveles de la proteína CTLA-4 en una muestra biológica *in vitro*.

[00199] La evaluación del nivel de expresión de la proteína CTLA-4 tiene por objeto incluir la medición o estimación de manera cualitativa o cuantitativa el nivel de una proteína CTLA-4 en una primera muestra biológica

ya sea directamente (por ejemplo, mediante determinación o estimación del nivel absoluto de la proteína) o relativamente (por ejemplo, por compararon con el nivel de proteína asociado con la enfermedad en una segunda muestra biológica). El nivel de expresión del polipéptido CTLA-4 en la primera muestra biológica se puede medir o estimar y luego comparar con un nivel de proteína CTLA-4 estándar, donde dicho estándar se toma de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no sufre del trastorno o se determina promediando los niveles de una población de individuos que no sufren del trastorno. Como se podrá apreciar en el arte, una vez que se conoce el nivel “estándar” del polipéptido CTLA-4, se puede emplear repetidamente como un estándar para comparaciones.

[00200] Según se usa en la presente, el término “muestra biológica” se refiere a cualquier muestra biológica obtenida de un sujeto, una línea celular, un tejido u otra fuente de células que potencialmente expresan CTLA-4. Los métodos para obtener biopsias de tejidos y de fluidos corporales de animales (por ejemplo, humanos) son bien conocidos en el arte. Las muestras biológicas incluyen células mononucleares de sangre periférica.

[00201] Un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se describe en la presente se puede usar en aplicaciones de pronóstico, diagnóstico, monitoreo y selección, incluyendo las aplicaciones *in vitro* e *in vivo* bien conocidas y estándar para el especialista y sobre la base de la presente descripción. Se pueden utilizar ensayos y conjuntos de elementos de pronóstico, diagnóstico, monitoreo y selección para una valoración y evaluación *in vitro* del estado del sistema inmunológico y/o de respuesta inmune para predecir, diagnosticar y monitorear las muestras de

pacientes a evaluar, incluyendo aquellas que se sabe o se sospecha que presentan una disfunción del sistema inmunológico o con respecto a una respuesta del sistema inmunológico, una respuesta de antígeno o una respuesta de vacuna anticipada o deseada. La valoración y evaluación del estado del sistema inmunológico y/o de una respuesta inmune también es de utilidad para determinar la aptitud de un paciente para un estudio clínico de un fármaco o para la administración de un agente quimioterapéutico o de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo particular, incluyendo combinaciones de los mismos, versus un agente o anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que es diferente. Este tipo de monitoreo y valoración de pronóstico y diagnóstico ya está en uso con el empleo de anticuerpos contra la proteína HER2 en el cáncer de mama (HercepTest™, Dako), donde el ensayo también se usa para evaluar a los pacientes para una terapia con anticuerpos utilizando Herceptin®. Las aplicaciones *in vivo* incluyen una terapia celular dirigida y modulación del sistema inmunológico y obtención de imágenes radiológicas de las respuestas inmunológicas.

[00202] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o una composición farmacéutica de la presente invención para su uso como un elemento de diagnóstico.

[00203] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o una composición farmacéutica de la presente invención para su uso en un método de predicción, diagnóstico y/o monitoreo de una disfunción del sistema inmunológico y/o cáncer.

[00204] En una forma de realización, la presente invención se

relaciona con el uso de un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención para predecir, diagnosticar y/o monitorear una disfunción del sistema inmunológico y/o del cáncer en un sujeto mediante evaluación y/o detección de los niveles de la proteína CTLA-4 en una muestra biológica del sujeto *in vitro*.

[00205] En una forma de realización, se puede usar un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión al antígeno del mismo en la inmunohistoquímica de muestras de biopsias. En otra forma de realización, se puede usar un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión al antígeno del mismo para detectar los niveles de CTLA-4, o los niveles de células que contienen CTLA-4 sobre la superficie de sus membranas, donde dichos niveles se pueden relacionar con algunos síntomas de enfermedad. Los anticuerpos anti-CTLA-4 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se describen en la presente pueden comprender una marca detectable o funcional. Cuando se usan marcas de fluorescencia, se pueden utilizar procedimientos de microscopía y análisis de separación de celular activada por fluorescencia (FACS) o una combinación de ambos métodos disponibles actualmente, conocidos en el arte para identificar y para cuantificar miembros de unión específicos. Los anticuerpos anti-CTLA-4 o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se describen en la presente pueden comprender una marca fluorescente. Los ejemplos de marcas de fluorescencia incluyen, por ejemplo, sondas reactivas y conjugadas, por ejemplo Aminocoumarina, Fluoresceína y rojo Texas, colorantes Alexa Fluor, colorantes Cy y colorantes DyLight. Un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender una marca radioactiva, tales como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au ,

^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac y ^{186}Re . Cuando se utilizan marcas radioactivas, se pueden emplear los procedimientos de conteo disponibles actualmente que son conocidos en el arte para identificar y cuantificar la unión específica del anticuerpo anti-CTLA-4, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, al CTLA-4 (por ejemplo, al CTLA-4 humano). En el caso que la marca es una enzima, la detección se puede efectuar mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas utilizadas actualmente y que son conocidas en el arte. Esto se puede lograr mediante el contacto de una muestra o una muestra control con un anticuerpo anti-CTLA-4, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo y CTLA-4. Se detecta cualquier complejo formado entre el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo y CTLA-4 y se compara en la muestra y el control. A la luz de la unión específica de los anticuerpos descritos en la presente para CTLA-4, los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, se pueden usar para detectar específicamente la expresión del CTLA-4 sobre la superficie de las células. Los anticuerpos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se describen en la presente también se pueden usar para purificar el CTLA-4 mediante una purificación por inmunoafinidad. La presente también incluye un sistema de ensayos que se pueden preparar en la forma de un conjunto de elementos de prueba para el análisis cuantitativo del grado de presencia, por ejemplo, del CTLA-4 o de complejos de CTLA-4/ligando de CTLA-4. El sistema o conjunto de elementos de prueba puede comprender un componente marcado, por ejemplo, un

anticuerpo marcado y uno o más reactivos inmunoquímicos adicionales.

[00206] En una forma de realización, la presente invención se relaciona con un método *in vitro* para evaluar y/o detectar los niveles de la proteína CTLA-4 en una muestra biológica que comprende (1) poner una muestra y opcionalmente una muestra de control en contacto con un anticuerpo anti-CTLA-4, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, de la invención bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo y CTLA-4 y (2) detectar y comparar los complejos formados en la muestra y opcionalmente el control.

5.5 Polinucleótidos, vectores y métodos para producir anticuerpos anti-CTLA-4

[00207] En otro aspecto, en la presente se proveen polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito en la presente, o un fragmento del mismo, (por ejemplo, una región variable de la cadena liviana y/o una región variable de la cadena pesada) que se une específicamente a un antígeno de CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano), y vectores, por ejemplo, vectores que comprenden dichos polinucleótidos para una expresión recombinante en células huésped (por ejemplo, *E. coli* y células de mamíferos). En la presente se proveen polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos provistos en la presente, así como vectores que comprenden tales secuencias de polinucleótidos, por ejemplo, vectores de expresión para una expresión eficaz en células huésped, por ejemplo, células de mamífero.

[00208] Según se usa en la presente, un polinucleótido o una

molécula de ácido nucleico “aislada” es aquel que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural (por ejemplo, en un ratón o un ser humano) de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico “aislada”, tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetizan químicamente. Por ejemplo, la frase “sustancialmente libre” incluye preparaciones de polinucleótidos o de moléculas de ácido nucleico que comprenden menos de aproximadamente un 15%, un 10%, un 5%, un 2%, un 1%, un 0,5% o un 0,1% (en particular menos de aproximadamente un 10%) de otro material, por ejemplo, un material celular, medio de cultivo, otras moléculas de ácido nucleico, precursores químicos y/u otras sustancias químicas. En una forma de realización específica, dichas una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo descrito en la presente están aisladas o purificadas.

[00209] En aspectos particulares, en la presente se proveen polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, que se unen específicamente a un polipéptido CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano) y comprende una secuencia de aminoácidos descrita en la presente, así como anticuerpos que compiten con estos anticuerpos por la unión a un polipéptido CTLA-4 (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) o que se une al mismo epítopo que el epítopo de dichos anticuerpos.

[00210] En determinados aspectos, en la presente se proveen

polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena liviana o la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente. Los polinucleótidos pueden comprender secuencias de nucleótidos que codifican una cadena liviana que comprende las FR y CDR VL de los anticuerpos descritos en la presente (véase, por ejemplo, la Tabla 1).

[00211] En la presente también se proveen polinucleótidos que codifican un anticuerpo anti-CTLA-4 que están optimizados, por ejemplo, mediante optimización de codones/ARN, sustitución con secuencias señal heterólogas y eliminación de elementos inestables del ARNm. Los métodos para generar ácidos nucleicos optimizados que codifican un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento del mismo (por ejemplo, la cadena liviana, la cadena pesada, el dominio VH o el dominio VL) para una expresión recombinante mediante introducción de cambios de codones y/o eliminación de regiones inhibitoras en el ARNm pueden llevarse a cabo mediante la adaptación consecuente de los métodos de optimización que se describen, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N°: 5.965.726; 6.174.666; 6.291.664; 6.414.132; y 6.794.498. Por ejemplo, se pueden mutar los posibles sitios de corte y empalme y los elementos de inestabilidad (por ejemplo, elementos ricos en A/T o/U) en el ARN sin alterar los aminoácidos codificados por las secuencias de ácido nucleico a fin de aumentar la estabilidad del ARN para la expresión recombinante. Las alteraciones emplean la degeneración del código genético, por ejemplo, utilizando un codón alternativo para un aminoácido idéntico. En algunas formas de realización, puede ser deseable alterar uno o más codones para codificar una mutación conservadora, por ejemplo, un aminoácido similar de estructura química y propiedades y/o función similares al aminoácidos

original. Dichos métodos pueden aumentar la expresión de un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento del mismo en por lo menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o 100 veces o más con relación a la expresión de un anticuerpo anti-CTLA-4 codificado por polinucleótidos que no fueron optimizados.

[00212] En determinadas formas de realización, una secuencia de polinucleótidos optimizada que codifica un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento del mismo (por ejemplo, un dominio VL y/o un dominio VH) descrito en la presente se puede hibridizar con un polinucleótido antisentido (por ejemplo, complementario) de una secuencia de polinucleótidos no optimizada que codifica un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento del mismo (por ejemplo, un dominio VL y/o un dominio VH) descrito en la presente. En formas de realización específicas, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento descrito en la presente se hibridiza bajo condiciones de gran severidad con un polinucleótido antisentido de una secuencia de polinucleótidos no optimizada que codifica un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento del mismo descrito en la presente. En una forma de realización específica, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento del mismo descrito en la presente se hibridiza bajo gran severidad, o condiciones de severidad intermedia o baja con un polinucleótido antisentido de una secuencia de nucleótidos no optimizada que codifica un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento del mismo descrito en la presente. Hay información relativa a las condiciones de hibridación ya descrita, véase, por ejemplo, la publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. N°:

US 2005/0048549 (por ejemplo, los párrafos 72-73), que se incorpora en la presente a modo de referencia.

[00213] Se pueden obtener los polinucleótidos y se puede determinar la secuencia de nucleótidos de dichos polinucleótidos mediante cualquier método conocido en el arte. Las secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en la presente, por ejemplo, los anticuerpos descritos en la Tabla 1, y versiones modificadas de estos anticuerpos se pueden determinar utilizando métodos bien conocidos en el arte, es decir, se ensamblan codones de nucleótidos que se sabe que codifican aminoácidos particulares de manera tal de generar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Dicho polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede ensamblar a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier G et al., (1994), *BioTechniques* 17: 242-6) que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, linealización y ligamiento de estos oligonucleótidos, y después la amplificación de los oligonucleótidos ligados mediante PCR.

[00214] Como alternativa, se pueden generar un polinucleótido que codifica un anticuerpo descrito en la presente a partir del ácido nucleico de una fuente adecuada (por ejemplo, un hibridoma) utilizando métodos bien conocidos en el arte (por ejemplo, PCR y otros métodos de clonación molecular). Por ejemplo, se puede conducir una amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridizables con los extremos 3' y 5' de una secuencia conocida y utilizando ADN genómico obtenido de células de hibridoma que producen el anticuerpo de interés. Dichos métodos de

amplificación de PCR se pueden usar para obtener ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que codifica la cadena liviana y/o la cadena pesada de un anticuerpo. Estos métodos de amplificación de PCR se pueden usar para obtener ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que codifica la región variable de la cadena liviana y/o la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados se pueden clonar en vectores para su expresión en células huésped y para una clonación adicional, por ejemplo, para generar anticuerpos quiméricos y humanizados.

[00215] Si no se dispone de un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, se puede obtener o sintetizar químicamente un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc del anticuerpo o una biblioteca de ADNc generada a partir del anticuerpo, o ácidos nucleicos, preferiblemente ARN poli A+, aislados de cualquier tejido o célula que expresa el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo descrito en la presente) mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos que se pueden hibridizar con los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica de la secuencia genética particular a fin de identificar, por ejemplo, un clon de ADNc de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR se pueden clonar luego en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en el arte.

[00216] El ADN que codifica los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en la presente se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos

convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesada y liviana de los anticuerpos anti-CTLA-4). Las células de hibridoma pueden servir como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede incluir en vectores de expresión, que luego son transfectados en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO) (por ejemplo, células CHO de CHO GS System™ (Lonza)) o células de mieloma que no producen de otra manera proteínas de inmunoglobulinas, para lograr la síntesis de anticuerpos anti-CTLA-4 en las células huésped recombinantes.

[00217] Para generar anticuerpos completos, se pueden usar cebadores para PCR que incluyan secuencias de nucleótidos VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia flanqueadora a fin de proteger el sitio de restricción para amplificar las secuencias VH o VL en clones de scFv. Utilizando técnicas de clonación conocidas por los especialistas en el arte, se pueden clonar los dominios VH amplificados por PCR en vectores que expresan una región constante de la cadena pesada, por ejemplo, la región constante gamma 4 humana, y se pueden clonar los dominios VL amplificados por PCR en vectores que expresan una región constante de la cadena liviana, por ejemplo, las regiones constantes kappa o lambda humanas. En determinadas formas de realización, los vectores que se usarán para expresar los dominios VH o VL comprenden un promotor EF-1á, una señal de secreción, un sitio de clonación para la región variable, dominios constantes y un marcador de selección tal como neomicina. Los dominios VH y VL también se pueden clonar en un vector que expresa las regiones constantes necesarias.

Después se co-transfectan los vectores de conversión de la cadena pesada y los vectores de conversión de la cadena liviana en líneas celulares a fin de generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, usando técnicas conocidas por los especialistas en el arte.

[00218] También se puede modificar el ADN, por ejemplo, por sustitución de la secuencia codificante para los dominios constantes de las cadenas pesadas y livianas humanas en lugar de las secuencias de murinos o mediante unión covalente de la secuencia codificante de la inmunoglobulina a todo o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es de una inmunoglobulina.

[00219] Se proveen asimismo polinucleótidos que se hibridizan bajo condiciones de hibridación de gran severidad o de severidad intermedia o más baja con los polinucleótidos que codifican un anticuerpo descrito en la presente. En formas de realización específicas, los polinucleótidos descritos en la presente se hibridizan bajo condiciones de hibridación de gran severidad, de severidad intermedia o más baja con los polinucleótidos que codifican un dominio VH y/o dominio VL provistos en la presente.

[00220] Las condiciones de hibridación están descritas en el arte y son conocidas por un especialista en el arte. Por ejemplo, una hibridación bajo condiciones severas puede comprender hibridación con un ADN unido a filtros en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 6x aproximadamente a 45 °C seguido por uno o más lavados en SSC 0,2x/SDS 0,1% aproximadamente a 50-65 °C; una hibridación bajo condiciones de gran severidad puede comprender una hibridación con un ácido nucleico unido a filtros en SSC 6x

aproximadamente a 45 °C seguido por uno o más lavados en SSC 0,1x/SDS 0,2% aproximadamente a 68 °C. La hibridación bajo otras condiciones de hibridación severas es conocida por los especialistas en el arte y se ha descrito, véase, por ejemplo, Ausubel FM et al., eds., (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, volumen I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3.

[00221] En determinados aspectos, en la presente se proveen células (por ejemplo, células huésped) que expresan (por ejemplo, de manera recombinante) los anticuerpos descritos en la presente (o un fragmento de unión al antígeno de los mismos) que se unen específicamente al CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano) y polinucleótidos y vectores de expresión relacionados. En la presente se proveen vectores (por ejemplo, vectores de expresión) que comprenden polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos anti-CTLA-4, o un fragmento, para una expresión recombinante en células huésped, preferiblemente en células de mamífero. También se proveen en la presente células huésped que comprenden dichos vectores para expresar de manera recombinante los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en la presente (por ejemplo, un anticuerpo humano o humanizado). En un aspecto particular, en la presente se proveen procedimientos para producir un anticuerpo descrito en la presente, que comprenden expresar dicho anticuerpo a partir de una célula huésped.

[00222] La expresión recombinante de un anticuerpo descrito en la presente (por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa, una cadena pesada y/o liviana de un anticuerpo o un anticuerpo de cadena simple descrito en la presente) que se une específicamente al CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4

humano) comprende la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Después de obtener un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, una cadena pesada y/o liviana de un anticuerpo o un fragmento de la misma (por ejemplo, las regiones variables de una cadena pesada y/o liviana) descrito en la presente, se puede producir un vector para la producción de la molécula de anticuerpo mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en el arte. Por consiguiente, en la presente se describen métodos para preparar una proteína mediante expresión de un polinucleótido que contiene un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, una cadena liviana o una cadena pesada) que codifica secuencias de nucleótidos. Se pueden emplear métodos que son bien conocidos por los especialistas en el arte para construir los vectores de expresión que contienen las secuencias que codifican los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, una cadena liviana o una cadena pesada) y señales de control de la transcripción y traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, las técnicas de ADN recombinante *in vitro*, las técnicas de síntesis y la recombinación genética *in vivo*. También se proveen vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo descrito en la presente, una cadena pesada o liviana de un anticuerpo, una región variable de cadena pesada o liviana de un anticuerpo o un fragmento del mismo, o una CDR de la cadena pesada o liviana, ligada operativamente a un promotor. Dichos vectores pueden incluir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, las publicaciones Internacionales N°: WO 86/05807 y WO 89/01036; y la Patente

de los EE.UU. N°: 5.122.464) y las regiones variables del anticuerpo se pueden clonar en dicho vector para la expresión de la cadena pesada completa, la cadena liviana completa o ambas cadenas pesadas y livianas completas.

[00223] Se puede transferir un vector de expresión a una célula (por ejemplo, una célula huésped) mediante técnicas convencionales y luego se pueden cultivar las células resultantes mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo descrito en la presente o un fragmento del mismo. Por lo tanto, en la presente se proveen células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo descrito en la presente o fragmentos del mismo, o una cadena pesada o liviana del mismo, o un fragmento de la misma, o un anticuerpo de cadena simple descrito en la presente, ligado operativamente a un promotor para la expresión de dichas secuencias en la célula huésped. En determinadas formas de realización, para expresar anticuerpos de cadena doble, los vectores que codifican ambas cadenas pesadas y livianas, de manera individual, se pueden coexpresar en la célula huésped para expresar la molécula de inmunoglobulina, según se detalla a continuación. En algunas formas de realización, la célula huésped contiene un vector que comprende un polinucleótido que codifica tanto la cadena pesada y la cadena liviana de un anticuerpo descrito en la presente, o un fragmento del mismo. En formas de realización específicas, la célula huésped contiene dos vectores diferentes, un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente, o un fragmento del mismo, y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena liviana o una región variable de la cadena liviana de un anticuerpo descrito en la presente, o

un fragmento del mismo. En otras formas de forma de realización, una primera célula huésped comprende un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente, o un fragmento del mismo, y una segunda célula huésped comprende un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena liviana o una región variable de la cadena liviana de un anticuerpo descrito en la presente. En formas de realización específicas, la cadena pesada/región variable de la cadena pesada expresada por la primera célula está asociada con una cadena liviana/región variable de la cadena liviana de la segunda célula para formar un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En determinadas formas de realización, en la presente se provee una población de células huésped que comprenden dicha primera célula huésped y dicha segunda célula huésped.

[00224] En una forma de realización particular, en la presente se provee una población de vectores que comprende un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena liviana/región variable de la cadena liviana de un anticuerpo anti-4-CTLA descrito en la presente, y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada/región variable de la cadena pesada de un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente.

[00225] Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión en huéspedes para expresar las moléculas de anticuerpo descritas en la presente (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°: 5.807.715). Dichos sistemas de expresión en huéspedes representan vehículos por los

cuales se pueden producir y subsiguientemente purificar las secuencias codificantes de interés, pero también representan células que pueden expresar una molécula de anticuerpo que se describe en la presente *in situ*, cuando son transformadas o transfectadas con las secuencias de nucleótidos codificantes apropiadas. Estos incluyen pero en un sentido no taxativo, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmidos o ADN de cósmidos que contienen secuencias de codificación del anticuerpo; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias de codificación del anticuerpo; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias de codificación del anticuerpo; sistemas de células vegetales (por ejemplo, algas verdes tal como *Chlamydomonas reinhardtii*) infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus en mosaico de la coliflor, CaMV; virus en mosaico de tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, el plásmido Ti) que contiene las secuencias de codificación del anticuerpo; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS (por ejemplo, COS1 o COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa y NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 y BMT10) que contienen construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, el promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7.5K

del virus vaccinia). En una forma de realización específica, las células para expresar los anticuerpos descritos en la presente o un fragmento de unión al antígeno de los mismos son células CHO, por ejemplo células CHO de CHO GS System™ (Lonza). En una forma de realización particular, las células para expresar los anticuerpos descritos en la presente son células humanas, por ejemplo, líneas celulares humanas. En una forma de realización específica, el vector de expresión de mamífero es pOptiVEC™ o pADNc3.3. En una forma de realización particular, se usan células bacterianas, tal como *Escherichia coli*, o células eucariotas (por ejemplo, células de mamífero), en especial para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante, para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio mayor del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para los anticuerpos (Foecking MK & Hofstetter H (1986) *Gene* 45: 101-5; y Cockett MI *et al.*, (1990) *Biotechnology* 8(7): 662-7). En determinadas formas de realización, los anticuerpos descritos en la presente se producen en células CHO o células NS0. En una forma de realización específica, la expresión de secuencias de nucleótidos que codifica los anticuerpos descritos en la presente que se unen específicamente al CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano) está regulada por un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de tejidos.

[00226] En los sistemas bacterianos, se puede seleccionar ventajosamente una cantidad de vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que está siendo expresada. Por

ejemplo, cuando se desea producir una gran cantidad de dicho anticuerpo, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, puede ser deseable emplear vectores que dirijan la expresión de niveles altos de productos de proteínas de fusión que se puedan purificar fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero en un sentido no taxativo, el vector de expresión pUR278 de *E. coli* (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) *EMBO J* 2: 1791-1794), en el cual se puede ligar la secuencia de codificación del anticuerpo de manera individual en el vector en marco con la región de codificación de lac Z de modo tal que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye S & Inouye M (1985) *Nuc Acids Res* 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) *J Biol Chem* 24: 5503-5509); y semejantes. Por ejemplo, también se pueden usar vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con la glutatión 5-transferasa (GST). En general, estas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión a una matriz de esferas de agarosa-glutatión seguido por elución en la presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de clivaje de trombina o proteasa de factor Xa para que el producto genético blanco clonado pueda ser liberado del grupo GST.

[00227] En un sistema de insectos, se puede usar el virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), por ejemplo, como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. Las secuencias codificantes del anticuerpo se pueden clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y ubicar bajo el control de un promotor del AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

[00228] En las células huésped de mamífero, se pueden utilizar numerosos sistemas de expresión basados en virus. En los casos en donde se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de codificación del anticuerpo de interés se puede ligar a un complejo de control de la transcripción/traducción adenoviral, por ejemplo, la secuencia del promotor tardío y de la directriz tripartita. Este gen quimérico se puede insertar luego en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y tiene la capacidad de expresar la molécula de anticuerpo en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan J & Shenk T (1984) *PNAS* 81(12): 3655-9). También puede ser necesario usar señales de inicio específicas para una traducción eficiente de las secuencias codificantes del anticuerpo insertadas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Aún más, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Estas señales exógenas de control de la traducción y los codones de inicio pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. Se puede mejorar la eficiencia de la expresión mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción apropiados, etc. (véase, por ejemplo, Bitter G *et al.*, (1987) *Methods Enzymol.*, 153:516-544).

[00229] Además, se puede elegir la cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o que modifica y procesa al producto genético de la manera específica deseada. Dichas modificaciones

(por ejemplo, glucosilación) y el procesamiento (por ejemplo, clivaje) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Hay diferentes células huésped que tienen características y mecanismos específicos para efectuar el procesamiento de post-traducción y la modificación de las proteínas y los productos genéticos. Las líneas celulares o los sistemas de huéspedes apropiados se pueden elegir a fin de asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para tal fin, se pueden usar células huésped eucariotas que posean la maquinaria celular apropiada para procesar el transcripto primario, para glicosilar y para fosforilar el producto genético. Dichas células de mamífero huésped incluyen, pero en un sentido no taxativo, células CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma de murino que no produce ninguna cadena de inmunoglobulina endógenamente), CRL7030, COS (por ejemplo, COS1 o COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 y HsS78Bst. En determinadas formas de realización, los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en la presente se producen en células de mamífero, tales como células CHO.

[00230] En una forma de realización específica, los anticuerpos descritos en la presente o fragmentos de unión al antígeno de los mismos tienen un contenido reducido de fucosa o no contienen fucosa. Dichos anticuerpos se pueden producir usando técnicas conocidas por un especialista en el arte. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden expresar en células deficientes o carentes de la capacidad para fucosilar. En un ejemplo específico, se pueden usar líneas celulares con noqueo de ambos alelos de la

α 1,6-fucosiltransferasa para producir anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos con un contenido reducido de fucosa. El sistema Potelligent[®] (Lonza) es un ejemplo de un sistema tal que se puede usar para producir anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos con un contenido reducido de fucosa.

[00231] Para una producción a largo plazo, de gran rendimiento, de las proteínas recombinantes se pueden generar células de expresión estable. Por ejemplo, se pueden manipular líneas celulares que expresan de manera estable un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En formas de realización específicas, una célula provista en la presente expresa de manera estable una cadena liviana/región variable de la cadena liviana y una cadena pesada/región variable de la cadena pesada que se asocian para formar un anticuerpo descrito en la presente o un fragmento de unión al antígeno del mismo.

[00232] En determinados aspectos, en lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped se pueden transformar con ADN controlado por los elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, secuencias promotoras, potenciadoras, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN/polinucleótido extraño, las células manipuladas se pueden dejar crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de manera estable al plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar foco que a su vez se puede clonar y

expandir en líneas celulares. Este método se puede usar ventajosamente para manipular líneas celulares que expresan un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente o un fragmento del mismo. Dichas líneas celulares manipuladas mediante ingeniería genética pueden ser de particular utilidad para examinar y evaluar las composiciones que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

[00233] Se pueden utilizar numerosos sistemas de selección, que incluyen, pero en un sentido no taxativo, los genes de la timidina quinasa (Wigler M et al, (1977) *Cell* 11 (1): 223-32), de la hipoxantinaguanina fosforibosiltransferasa (Szybalska EH & Szybalski W (1962) *PNAS* 48(12): 2026-2034) y de la adenina fosforibosiltransferasa (Lowy I et al., (1980) *Cell* 22(3): 817-23) del virus Herpes simple en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, se puede usar resistencia a antimetabolitos como la base de selección para los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler M et al, (1980) *PNAS* 77 (6): 3567-70; O'Hare K et al., (1981) *PNAS* 78: 1527-1531); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan RC & Berg P (1981) *PNAS* 78 (4): 2072-6); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu & Wu GY CH (1991) *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 32: 573-596; Mulligan RC (1993) *Science* 260: 926-932; y Morgan RA & Anderson WF (1993) *Ann Rev Biochem* 62: 191-217; Nabel GJ y Felgner PL (1993) *Trends Biotechnol* 11 (5): 211-5); e hygro, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre RF et al, (1984) *Gene* 30 (1-3): 147-56). Se pueden usar de manera rutinaria los métodos conocidos comúnmente en el arte de la tecnología de ADN recombinante para seleccionar el clon recombinante deseado, y dichos

métodos se describen, por ejemplo, en Ausubel FM et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli NC et al., (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., *J. Mol. Biol.*, 150: 1 (1981), que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

[00234] Se pueden aumentar los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo mediante amplificación del vector (por una revisión, véase Bebbington CR & Hentschel CCG, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, volumen 3 (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresa el anticuerpo es amplificable, un aumento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará la cantidad de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, también aumentará la producción del anticuerpo (Crouse et al GF, (1983) *Mol Cell Biol.* 3: 257-66).

[00235] La célula huésped se puede co-transfectar con dos o más vectores de expresión descritos en la presente, donde el primer vector codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector codifica un polipéptido derivado de la cadena liviana. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de los polipéptidos de las cadenas pesada y liviana. Las células huésped se pueden co-transfectar con diferentes cantidades de dichos dos o más vectores de expresión. Por ejemplo, las células huésped se pueden transfectar con

cualquiera de las siguientes relaciones de un primer vector de expresión a un segundo vector de expresión: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 ó 1:50.

[00236] Como alternativa, se puede usar un solo vector que codifica, y puede expresar, ambos polipéptidos de las cadenas pesada y liviana. En tales casos, la cadena liviana se debe ubicar antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot NJ (1986) *Nature* 322: 562-565; y Köhler G (1980) *PNAS* 77: 2197-2199). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y liviana pueden comprender ADNc o ADN genómico. El vector de expresión puede ser monocistrónico o multicistrónico. Una construcción de ácido nucleico multicistrónico puede codificar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, o un rango de 2-5, 5-10 ó 10-20, de secuencias de genes/nucleótidos. Por ejemplo, una construcción de ácido nucleico bicistrónica puede comprender, en el orden siguiente, un promotor, un primer gen (por ejemplo, de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en la presente) y un segundo gen (por ejemplo, de la cadena liviana de un anticuerpo descrito en la presente). En dicho vector de expresión, la transcripción de ambos genes puede ser dirigida por el promotor, mientras que la traducción del ARNm del primer gen puede ser mediante un mecanismo de barrido dependiente de cap y la traducción del ARNm a partir del segundo gen puede ser por un mecanismo independiente de cap, por ejemplo, mediante un IRES.

[00237] Después de producir una molécula de anticuerpo descrita en la presente mediante expresión recombinante, se puede purificar con cualquier método conocido en el arte para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo,

intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad para el antígeno específico después de una cromatografía en columna de exclusión por tamaño y Proteína A), centrifugación, solubilidad diferencial o cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos descritos en la presente se pueden fusionar con las secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en la presente o conocidas de otra manera en el arte para facilitar la purificación.

[00238] En formas de realización específicas, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en la presente está aislado o purificado. En general, un anticuerpo aislado es aquel que está sustancialmente libre de otros anticuerpos con diferentes especificidades antigénicas que el anticuerpo aislado. Por ejemplo, en una forma de realización particular, la preparación de un anticuerpo descrito en la presente está sustancialmente libre de material celular y/o de precursores químicos. El término “sustancialmente libre de material celular” incluye preparaciones de un anticuerpo en las cuales la proteína está separada de los componentes celulares de las células de las cuales fueron aisladas o producidas de manera recombinante. Por consiguiente, un anticuerpo que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de anticuerpo que comprenden menos que aproximadamente un 30%, un 20%, un 10%, un 5%, un 2%, un 1%, un 0,5% o un 0,1% (en peso seco) de la proteína heteróloga (también denominada “proteína contaminante” en la presente) y/o variantes de un anticuerpo, por ejemplo, diferentes formas modificadas de postraducción de un anticuerpo u otras versiones diferentes de un anticuerpo (por ejemplo, fragmentos de anticuerpo). Cuando el anticuerpo es producido de manera

recombinante, también está sustancialmente libre en general de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20%, un 10%, un 2%, un 1%, un 0,5% o un 0,1% del volumen de la preparación de la proteína. Cuando el anticuerpo se produce mediante síntesis química, en general está sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, está separada de precursores químicos u otros productos químicos que están relacionados con la síntesis de la proteína. Por lo tanto, dichas preparaciones del anticuerpo tienen menos que aproximadamente un 30%, un 20%, un 10% o un 5% (en peso seco) de precursores químicos o de compuestos distintos del anticuerpo de interés. En una forma de realización específica, los anticuerpos que se describen en la presente están aislados o purificados.

[00239] Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente al CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano) se pueden producir mediante cualquier método conocido en el arte de síntesis de anticuerpos, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante técnicas de expresión recombinantes. Los métodos que se describen en la presente emplean, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, análisis genético, ADN recombinante, química orgánica, bioquímica, PCR, síntesis y modificación de oligonucleótidos, hibridación de ácidos nucleicos y áreas relacionadas propias del conocimiento del arte. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en las referencias citadas en la presente y se explican acabadamente en la literatura. Véase, por ejemplo, Maniatis T *et al.*, (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (1989), *Molecular Cloning: A*

Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J *et al.*, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B *et al.*, (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[00240] En una forma de realización específica, un anticuerpo descrito en la presente es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo recombinante) preparado, expresado, creado o aislado mediante cualquier medio que comprende la creación, por ejemplo, mediante síntesis o ingeniería genética, de secuencias de ADN. En determinadas formas de realización, dicho anticuerpo comprende secuencias (por ejemplo, secuencias de ADN o secuencias de aminoácidos) que no existen de manera natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos de un animal o mamífero (por ejemplo, seres humanos) *in vivo*.

[00241] En un aspecto, en la presente se provee un método de elaboración de un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que se une específicamente al CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano) que comprende cultivar una célula o célula huésped descrita en la presente. En un aspecto determinado, en la presente se provee un método de elaboración de un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une específicamente al CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano), que comprende

expresar (por ejemplo, expresar de manera recombinante) el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la misma, usando una célula o una célula huésped descrita en la presente (por ejemplo, una célula o una célula huésped que comprende polinucleótidos que codifican un anticuerpo descrito en la presente). En una forma de realización particular, la célula es una célula aislada. En una forma de realización particular, se han introducido polinucleótidos exógenos en la célula. En una forma de realización particular, el método comprende además el paso de purificar el anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, obtenido a partir de la célula o la célula huésped. Preferiblemente, el método se conduce *in vitro*.

[00242] Los métodos para producir anticuerpos policlonales son conocidos en el arte (véase, por ejemplo, el capítulo 11 en: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) quinta edición, Ausubel FM et al, eds, John Wiley and Sons, Nueva York).

[00243] Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una amplia variedad de procedimientos conocidos en el arte, que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir usando procedimientos de hibridomas que incluyen aquellos conocidos en el arte y aquellos que se describen, por ejemplo, en Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª edición (1988); Hammerling GJ, et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y., (1981). El término “anticuerpo monoclonal”, según se usa en la presente, no se limita a los anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridomas. Por ejemplo, los

anticuerpos monoclonales se pueden producir de manera recombinante a partir de células huésped que expresan exógenamente un anticuerpo descrito en la presente o un fragmento del mismo, por ejemplo, una cadena liviana y/o una cadena pesada de dicho anticuerpo.

[00244] En formas de realización específicas, un "anticuerpo monoclonal", según se usa en la presente, es un anticuerpo producido por una sola célula (por ejemplo, un hibridoma o una célula huésped productora de un anticuerpo recombinante), en donde el anticuerpo se une específicamente al CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano), determinada, por ejemplo, mediante un ELISA u otro ensayo de unión a antígenos o competitivo conocido en el arte o en los ejemplos provistos en la presente. En formas de realización particulares, un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. En determinadas formas de realización, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monovalente o un anticuerpo multivalente (por ejemplo, bivalente). En formas de realización particulares, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monoespecífico o multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico). Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente se pueden elaborar, por ejemplo, mediante el procedimiento del hibridoma como se describe en Kohler G y Milstein C (1975) *Nature* 256: 495 o se pueden aislar, por ejemplo, de bibliotecas de fagos utilizando, por ejemplo, las técnicas que se describen en la presente. Otros métodos de preparación de líneas de células clonales y de anticuerpos monoclonales expresados de este modo son bien conocidos en el arte (véase, por ejemplo, el capítulo 11 en: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) quinta edición, Ausubel FM et al, *supra*).

[00245] Los métodos para producir y detectar anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma son de rutina y bien conocidos en el arte. Por ejemplo, en el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como una oveja, cabra, conejo, rata, hámster o mono macaco, para generar linfocitos que producen o que pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína (por ejemplo, CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano)) usada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Los linfocitos se fusionan luego con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding JW (Ed), "*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Además, se puede utilizar una técnica de RIMMS (sitios múltiples de inmunización repetitiva) para inmunizar a un animal (Kilpatrick KE et al, (1997) *Hybridoma* 16: 381-9, que se incorpora por completo a modo de referencia).

[00246] En algunas formas de realización, los ratones (u otros animales, tales como ratas, monos, burros, cerdos, ovejas, hámster o perros) se pueden inmunizar con un antígeno (por ejemplo, el CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano)) y después de detectar una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero del ratón, se cosecha el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan luego con cualquier célula de mieloma apropiada, por ejemplo, células de la línea celular SP20, disponible en la *American Type Culture Collection* (ATTC, Manassas, Virginia, EE.UU.), de acuerdo con procedimientos bien conocidos. Los hibridomas se seleccionan y clonan mediante dilución limitada.

En determinadas formas de realización, se cosechan los nódulos linfáticos de los ratones inmunizados y se fusionan con células de mieloma NS0.

[00247] Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la sobrevivencia de las células de mieloma progenitoras no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma progenitoras no contienen la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), donde dichas sustancias impedirán el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

[00248] En formas de realización específicas se emplean células de mieloma que se fusionan de manera eficiente, soportan un nivel de producción alto y estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y que son sensibles a un medio, tal como el medio HAT. Estas líneas celulares de mieloma son líneas de mieloma de murino, tal como la línea celular NS0 o aquellas que derivan de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de *Salk Institute Cell Distribution Center*, San Diego, CA, EE.UU., y las células SP-2 o X63-Ag8.653 disponibles de *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, EE.UU.. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor D (1984) *J Immunol* 133: 3001-5; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

[00249] El medio de cultivo en el cual se hacen crecer las células de hibridoma es evaluado por la producción de anticuerpos monoclonales

dirigidos contra un CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano). La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante métodos conocidos en el arte, por ejemplo, inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

[00250] Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, se pueden subclonar los clones mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar utilizando métodos estándar (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, *supra*). Los medios de cultivo adecuados para tal fin incluyen, por ejemplo, el medio D-MEM o RPMI1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores de ascites en un animal.

[00251] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden separar convenientemente del medio de cultivo o líquido ascites o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía con proteína A-Sepharose, hidroxilapatita, electroforesis sobre gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

[00252] Los anticuerpos que se describen en la presente incluyen fragmentos de anticuerpo que reconocen un CTLA-4 específico (por ejemplo, un CTLA-4 humano) y se pueden generar mediante cualquier técnica conocida por los especialistas en el arte. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ descritos en la presente se pueden producir mediante el corte proteolítico de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para

producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos $F(ab')_2$). Un fragmento Fab corresponde a uno de los dos brazos idénticos de una molécula de anticuerpo y contiene la cadena liviana completa apareada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada. Un fragmento $F(ab')_2$ contiene los dos brazos de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo unidos mediante enlaces disulfuro en la región bisagra.

[00253] Además, los anticuerpos descritos en la presente o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, también se pueden generar usando varios métodos de presentación en fagos conocidos en el arte. En los métodos de presentación en fagos, se presentan dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de partículas de fagos que contienen las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL se amplifican a partir de bibliotecas de ADNc de animales (por ejemplo, bibliotecas de ADNc humano o murino de los tejidos afectados). El ADN que codifica los dominios VH y VL se recombinan junto con un conector de scFv por PCR y se clonan en un vector fagémido. El vector se puede introducir en *E. coli* mediante electroporación y luego se infecta *E. coli* con un fago auxiliar. Los fagos que se emplean en estos métodos típicamente son fagos filamentosos, que incluyen los fagos fd y M13, y los dominios V_H y V_L habitualmente se fusionan por recombinación con el gen III o el gen VIII del fago. Los fagos que expresan un dominio de unión al antígeno que se une un antígeno particular se pueden seleccionar o identificar con un antígeno, por ejemplo, usando un antígeno marcado o un antígeno unido o capturado sobre una superficie sólida o una esfera. Los ejemplos de métodos de expresión en fagos que se pueden usar para elaborar los

anticuerpos descritos en la presente incluyen aquellos que se divulgan en Brinkman U *et al.*, (1995) *J Immunol Methods* 182: 41-50; Ames RS *et al.*, (1995) *J Immunol Methods* 184: 177-186; Kettleborough CA *et al.*, (1994) *Eur J Immunol* 24: 952-958; Persic L *et al.*, (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280; Solicitud PCT N°: PCT/GB91/001134; publicaciones Internacionales N°: WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/1; WO 95/15982; WO 95/20401; y las Patentes de los EE.UU. N°: 5.698.426, 5,223.409, 5.403.484, 5,580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821,047, 5,571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 y 5.969.108.

[00254] Según se describió en las referencias precedentes, una vez seleccionados los fagos, las regiones codificantes del anticuerpo obtenidas de los fagos pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y pueden expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describirá más adelante. Las técnicas para producir de manera recombinante los fragmentos de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, también se pueden emplear usando métodos conocidos en el arte tales como los divulgados en la publicación PCT N°: WO 92/22324; Mullinax RL *et al.*, (1992) *BioTechniques* 12(6): 864-9; Sawai H *et al.*, (1995) *Am J Reprod Immunol* 34: 26-34; y Better M *et al.*, (1988) *Science* 240: 1041-1043.

[00255] En determinadas formas de realización, para generar anticuerpos completos, se pueden usar cebadores para PCR que incluyan

secuencias de nucleótidos VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia flanqueadora a fin de proteger el sitio de restricción para amplificar las secuencias VH o VL a partir de un templado, por ejemplo, clones de scFv. El uso de las técnicas de clonación conocidas por los especialistas en el arte, permite clonar los dominios VH amplificados por PCR en vectores que expresan una región constante de VH y clonar los dominios VL amplificados por PCR en vectores que expresan una región constante de VL, por ejemplo, las regiones constantes kappa o lambda humanas. Los dominios VH y VL también se pueden clonar en un vector que expresa las regiones constantes necesarias. Después se co-transfectan los vectores de conversión de la cadena pesada y los vectores de conversión de la cadena liviana en líneas celulares a fin de generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, por ejemplo, IgG, usando técnicas conocidas por los especialistas en el arte.

[00256] Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual las diferentes porciones del anticuerpo derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede contener una región variable de un anticuerpo monoclonal de ratón o rata fusionada a una región constante de un anticuerpo humano. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en el arte. Véase, por ejemplo, Morrison SL (1985) *Science* 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) *BioTechniques* 4: 214-221; Gillies SD *et al.*, (1989) *J Immunol Methods* 125: 191-202; y las Patentes de los EE.UU. N°: 5.807.715, 4.816.567, 4.816.397 y 6.331.415.

[00257] Un anticuerpo humanizado se puede unir a un antígeno predeterminado y que comprende una región de marco de trabajo que tiene

sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y CDR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo, una inmunoglobulina de murino). En formas de realización particulares, un anticuerpo humanizado también comprende por lo menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado se puede seleccionar entre cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, incluyendo, en un sentido no taxativo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los anticuerpos humanizados se pueden producir usando una variedad de técnicas conocidas en el arte que incluyen, pero en un sentido no taxativo, injerto de CDR (Patente Europea N°: EP 239400; publicación Internacional N°: WO 91/09967; y las Patentes de los EE.UU. N°: 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), reformulación de los residuos de superficie [*veneering*] o reemplazo de residuos de superficie [*resurfacing*] (Patentes de Europa N°: EP 592106 y EP 519596; Padlan EA (1991) *Mol Immunol* 28(4/5): 489-498; Studnicka GM *et al.*, (1994) *Prot Engineering* 7(6): 805-814; y Roguska MA *et al.*, (1994) *PNAS* 91: 969-973), entremezclado de cadenas (Patente de los EE.UU. N°: 5.565.332), y las técnicas divulgadas, por ejemplo, en la Patente de los EE.UU. N°: 6.407.213, Patente de los EE.UU. N°: 5.766.886, la publicación Internacional N°: WO 93/17105; Tan P *et al.*, (2002) *J Immunol* 169: 1119-25; Caldas C *et al.*, (2000) *Protein Eng.* 13(5): 353-60; Morea V *et al.*, (2000) *Methods* 20(3): 267-79; Baca M *et al.*, (1997) *J Biol Chem* 272(16): 10678-84; Roguska MA *et al.*, (1996) *Protein Eng* 9(10): 895 904; Couto JR *et al.*, (1995)

Cancer Res., 55(suplemento 23): 5973s-5977s; Couto JR *et al.*, (1995) *Cancer Res* 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) *Gene* 150(2): 409-10 y Pedersen JT *et al.*, (1994) *J Mol Biol* 235(3): 959-73. Véase también la publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: US 2005/0042664 A1 (24 de febrero, 2005), que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

[00258] Los métodos para elaborar anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) están descritos, véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 7.951.917; 7.183.076; 8.227.577; 5.837.242; 5.989.830; 5.869.620; 6.132.992 y 8.586.713.

[00259] Los anticuerpos de dominio único, por ejemplo, los anticuerpos que no contienen cadenas livianas, se pueden producir mediante métodos bien conocidos en el arte. Véase Riechmann L & Muyldermans S (1999) *J Immunol* 231: 25-38; Nuttall SD *et al.*, (2000) *Curr Pharm Biotechnol* 1(3): 253-263; Muyldermans S, (2001) *J Biotechnol* 74(4): 277-302; Patente de los EE.UU. N°: 6.005.079; y publicaciones Internacionales N°: WO 94/04678, WO 94/25591 y WO 01/44301.

[00260] Además, los anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno CTLA-4 se pueden utilizar a su vez para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imitan" un antígeno usando técnicas bien conocidas por los especialistas en el arte. (Véase, por ejemplo, Greenspan NS & Bona CA (1989) *FASEB J* 7(5): 437-444; y Nissinoff A (1991) *J Immunol* 147(8): 2429-2438).

[00261] En formas de realización particulares, un anticuerpo descrito en la presente, que se une al mismo epítopo del CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano) que un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en la presente, es

un anticuerpo humano o un fragmento de unión al antígeno del mismo. En formas de realización particulares, un anticuerpo descrito en la presente, que bloquea competitivamente (por ejemplo, de una manera dependiente de la dosis) la unión de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente, al CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano), es un anticuerpo humano o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Los anticuerpos humanos se pueden producir usando cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, se pueden utilizar los ratones transgénicos que no pueden expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de una inmunoglobulina humana. En particular, se pueden introducir complejos de genes de las cadenas pesada y liviana de inmunoglobulinas humanas aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, se puede introducir la región variable, la región constante y la región de diversidad humanas en células madre embrionarias de ratón además de los genes de la cadena pesada y liviana humanos. Los genes de las cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina de ratón se pueden volver no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de una inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, una delección homocigota de la región JH impide la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Luego se crían los ratones quiméricos para producir una descendencia homocigota que exprese anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera habitual con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un antígeno (por ejemplo,

CTLA-4). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener de los ratones transgénicos inmunizados usando la tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de la inmunoglobulina humana albergados en los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de células B, y posteriormente son sometidos a cambio de clases y mutación somática. Por lo tanto, el uso de una técnica de este tipo, permite producir anticuerpos de IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Por una descripción general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg N & D Huszar (1995) *Int Rev Immunol* 13: 65-93. Por una descripción detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y de los protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, la publicación Internacional N°: WO 98/24893, WO 96/34096 y WO 96/33735.; y las Patentes de los EE.UU. N°: 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318 y 5.939.598. Los ejemplos de ratones que pueden producir anticuerpos humanos incluyen Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; Patentes de los EE.UU. N°: 6.075.181 y 6.150.184.), Huab-Mouse™ (Medarex, Inc./Gen Pharm; Patente de los EE.UU. N°: 5.545.806 y 5.569, 825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) y KM Mouse™ (Medarex/Kirin).

[00262] Los anticuerpos humanos que se unen específicamente a CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano) se pueden elaborar mediante una variedad de métodos conocidos en el arte incluyendo métodos de presentación en fagos descritos precedentemente usando bibliotecas de anticuerpos derivados de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase también las Patentes de los EE.UU. N°: 4.444.887, 4.716.111 y 5.885.793; y las

publicaciones Internacionales N°: WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

[00263] En algunas formas de realización, los anticuerpos humanos se pueden producir usando hibridomas de ratón-humano. Por ejemplo, se pueden fusionar linfocitos de sangre periférica humana transformados con el virus de Epstein-Barr (EBV) con células de mieloma de ratón para producir hibridomas de ratón-humano que secretan anticuerpos monoclonales humanos, y estos hibridomas ratón-humano se pueden examinar para determinar las que secretan anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a un antígeno blanco (por ejemplo, CTLA-4 (por ejemplo, un CTLA-4 humano)). Dichos métodos son conocidos y se describen en el arte, véase, por ejemplo, Shinmoto H *et al.*, (2004) *Cytotechnology* 46: 19-23; Naganawa Y *et al.*, (2005) *Human Antibodies* 14: 27-31.

5.6 Conjuntos de elementos [Kits]

[00264] También se proveen conjuntos de elementos que comprenden uno o más anticuerpos descritos en la presente, o una composición farmacéutica o conjugados de los mismos. En una forma de realización específica, en la presente se provee un envase o conjunto de elementos farmacéutico que comprende uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, tal como uno o más anticuerpos provistos en la presente o un fragmento de unión al antígeno de los mismos. En algunas formas de realización, los conjuntos de elementos contienen una composición farmacéutica que se describe en la presente y cualquier agente profiláctico o terapéutico, tales como los que se describen en la presente. En determinadas

formas de realización, los conjuntos de elementos pueden contener un mitógeno de células T, tal como, por ejemplo, fitohemaglutinina (PHA) y/o acetato miristato de forbol (PMA) o un anticuerpo estimulante complejo del TCR, tal como un anticuerpo anti-CD3 y un anticuerpo anti-CD28. Opcionalmente, puede haber una nota asociada con dicho(s) recipiente(s) en el formulario prescrito por una agencia gubernamental reguladora acerca de la elaboración, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, donde dicha nota refleja la aprobación por la agencia de la elaboración, el uso o la venta para su administración a humanos.

[00265] También se proveen conjuntos de elementos que se pueden usar en los métodos precedentes. En una forma de realización, un conjunto de elementos comprende un anticuerpo descrito en la presente, preferiblemente un anticuerpo purificado, en uno o más recipientes. En una forma de realización específica, los conjuntos de elementos descritos en la presente contienen un antígeno CTLA-4 sustancialmente aislado (por ejemplo, un CTLA-4 humano) como control. En otra forma de realización específica, los conjuntos de elementos descritos en la presente comprenden además un anticuerpo control que no reacciona con un antígeno CTLA-4. En otra forma de realización específica, los conjuntos de elementos descritos en la presente contienen uno o más elementos para detectar la unión de un anticuerpo a un antígeno CTLA-4 (por ejemplo, el anticuerpo se puede conjugar con un sustrato detectable tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radioactivo o un compuesto luminiscente; o se puede conjugar un segundo anticuerpo que reconoce al primero con un sustrato detectable). En formas de realización específicas, el conjunto de elementos provisto en la

presente puede incluir un antígeno CTLA-4 producido de manera recombinante o sintetizado químicamente. El antígeno CTLA-4 provisto en el conjunto de elementos también se puede unir a un soporte sólido. En una forma de realización más específica, el medio de detección del conjunto de elementos descrito precedentemente incluye un soporte sólido al cual se une el antígeno CTLA-4. Dicho conjunto de elementos también puede incluir un anticuerpo anti-humano o un anticuerpo anti-ratón/rata marcado con informante no unido. En esta forma de realización, se puede detectar la unión del anticuerpo al antígeno CTLA-4 mediante la unión de dicho anticuerpo marcado con informante.

[00266] En una forma de realización, la presente invención se relaciona con el uso de un conjunto de elementos de la presente invención para evaluar y/o detectar *in vitro* el CTLA-4 humano en una muestra biológica.

6. EJEMPLOS

[00267] Los ejemplos en esta Sección (es decir, la Sección 6) se ofrecen con fines ilustrativos y no en un sentido limitativo.

6.1 Ejemplo 1: Caracterización del anticuerpo anti-CTLA-4

[00268] En este ejemplo se describe la caracterización de los anticuerpos que se unen al CTLA-4 humano. En particular, se caracterizó un anticuerpo designated AGEN1884 en numerosos ensayos que se describirán más adelante. El anticuerpo anti-CTLA-4, AGEN1884, comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 93; y una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15. El anticuerpo AGEN1884 es un anticuerpo de la IgG₁ humana que contiene una sustitución T109S (es decir, una sustitución de treonina por serina

en la posición 109 con relación a la secuencia Fc de tipo salvaje), numerada de acuerdo con Kabat, en el dominio constante de la cadena liviana, que facilita la clonación de la región variable en marco con la región constante. Esta mutación es una modificación conservadora que no afecta la unión o la función del anticuerpo. También se generó la contraparte de tipo salvaje, denominada AGEN1884w, que contiene una treonina en la posición 109, numerada de acuerdo con Kabat. El anticuerpo AGEN1884w es un anticuerpo de la IgG₁ humana que comprende una cadena pesada de la SEQ ID N°: 93 y una cadena liviana de la SEQ ID N°: 13.

6.1.1 Análisis cinético por resonancia de plasmón superficial

[00269] Se usó resonancia de plasmón superficial para determinar la afinidad del anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884 y un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia (sistema de sensibilidad mejorada BIAcore® T100/T200 (GE Healthcare) y un ensayo de captura Fab). Todas las interacciones se analizaron a 25 °C usando DPBS 1x (PAA, H15-002) más P20 (0,05%, Pierce, 28320) como solución amortiguadora de corrida. Los anticuerpos anti-CTLA-4 (8 µg/ml en solución amortiguadora de corrida) fueron capturados por la superficie del chip de un chip sensor CM5 (GE Healthcare, Serie S CM5, BR-1005-30) por un anticuerpo anti-Fab humano inmovilizado (GE Healthcare, Conjunto de elementos para Captura de Fab, 28958325). Para detectar las interacciones no específicas del antígeno CTLA-4, la captura de anticuerpos solamente se realizó en la celda de flujo 2, mientras que en la celda de flujo 1 solamente se inmovilizó el anticuerpo de captura. Después de la captura de los anticuerpos anti-CTLA-4, los antígenos CTLA-4 se corrieron a través de ambas celdas de flujo en cantidades diferentes. Específicamente, el

CTLA-4-Fc humano recombinante (R&D Systems, N° 7268-CT), el CTLA-4 humano recombinante (Sino Biological, N° 11159-H08H), el CTLA-4-Fc de cinomolgo recombinante (Sino Biological, N° 90213-C02H) y el CTLA-4 de cinomolgo recombinante (Sino Biological, N° 90213-C08H) se corrieron a razón de 100 nM, 25 nM y 6,25 nM; y el CTLA-4-Fc de ratón recombinante (R&D, N° 434-CT), el CTLA-4-Fc de rata recombinante (Sino Biological, N° 81069-R02H) y el CTLA-4 de rata recombinante (Sino Biological, N° 81069-R08H) se corrieron a razón de 400 nM, 100 nM y 25 nM. También se incluyó una curva blanco (solución amortiguadora de corrida solamente) en cada corrida. La asociación se corrió durante 90 segundos y la disociación durante 600 segundos con una velocidad de flujo de 10 μ l/min. Después de cada corrida, se condujo un paso de regeneración con 10 mM de glicina pH 2,0 (GE Healthcare, BR-1003-55) durante 60 segundos a razón de 30 μ l/min. Las curvas de unión se evaluaron usando el software de evaluación BIAcore® T200 versión 2.0.1 aplicando un modelo 1:1 de Langmuir con un ajuste global de Rmax. A partir de estos valores se calcularon las afinidades (K_D) de AGEN1884 y del anticuerpo anti-CTLA-4 de referencia para varios antígenos y se muestran en la Figura 1A. El CTLA-4 monomérico de cinomolgo recombinante, el CTLA-4-Fc de ratón y el CTLA-4 monomérico de rata usados en este estudio no aprobaron la evaluación de control de calidad. La unión de los anticuerpos anti-CTLA-4 a la proteína CTLA-4-Fc de ratón recombinante, que mostró un 50% de agregación, probablemente se debía a interacciones no específicas. El análisis por resonancia de plasmón superficial se repitió posteriormente dos veces usando el CTLA-4-Fc de ratón recombinante (Sino Biological, N° 81069-R02H) que pasó una evaluación de control de calidad a

360 nM, 120 nM, 40 nM y 13,3 nM del AGEN1884w. El AGEN1884w no mostró ninguna unión detectable al CTLA-4 de ratón.

6.1.2 Unión de los anticuerpos a células que sobreexpresan CTLA-4

[00270] Se mantuvieron células Jurkat que sobreexpresan el CTLA-4 humano (Promega) en RPMI1640 (Life Technologies) que contiene 10% de FBS (Gemini Bio Products), 100 µg/ml de Higromicina B (Gibco) y 500 µg/ml de G418 (Promega). Antes de la tinción con los anticuerpos, las células se lavaron una vez en solución amortiguadora FACS (PBS con 2% de FBS). Se agregaron diluciones en serie del AGEN1884w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y un control de isotipo de la IgG₁ comenzando con 10 µg/ml para duplicar los pocillos de placas de fondo redondo de 96 pocillos en un volumen de 100 µl y se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con 150 µl de solución amortiguadora FACS y se tiñeron con 100 µl de solución amortiguadora FACS que contiene 0,25 µl de anticuerpo anti-kappa humana de ratón conjugado con PE (Invitrogen) durante 30 minutos a 4 °C. Luego se lavaron las células dos veces y se volvieron a suspender en 100 µl de solución amortiguadora FACS. Las muestras se obtuvieron con un LSRFortessa (BD Biosciences). Se analizaron las intensidades de fluorescencia promedio (MFI) usando el software FlowJo (FlowJo, LLC) y se graficaron usando Prism 6 (GraphPad Software). Según se muestra en la Figura 1B, el anticuerpo AGEN1884w se unió al CTLA-4 humano expresado sobre la superficie de las células Jurkat.

6.1.3 Ensayo de selectividad del anticuerpo CTLA-4

[00271] Se evaluó la selectividad del AGEN1884 por CTLA-4 contra otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas usando

tecnología de ordenamientos en suspensión como un ensayo de multiplexado. Se acoplaron químicamente numerosos miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas a microesferas Luminex[®] usando una química estándar de NHS-éster. Se diluyeron materiales purificados del AGEN1884, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₁ de referencia y un control de isotipo de la IgG₁ en solución amortiguadora de ensayo (Roche 11112589001) hasta 10 ng/ml, 100 ng/ml y 1000 ng/ml. Brevemente, se incubaron 25 µl de cada dilución en oscuridad (20 °C, 650 rpm) con 1500 microesferas Luminex[®] en 5 µl de solución amortiguadora de ensayo durante 1 hora en placas filtrantes de 96 medio pocillos (Millipore, MABVN1250). Se acoplaron microesferas Luminex[®] con el CTLA-4-Fc humano recombinante (R&D Systems, N° 7268-CT), el CTLA-4-Fc de cinomolgo recombinante (Sino Biological, N° 90213-C02H), el rhCD28-Fc (R&D, N° 342-CD-200), el rhICOS-Fc (R&D, N° 169-CS-050), el rhBTLA-Fc (Sino Biological, N° 11896-H02H), el rhPD-1-Fc (R&D Systems, N° 1086-PD) o el PD-1-Fc de cinomolgo recombinante (producido por los autores) mediante acoplamiento de amina con el COOH de la superficie de la esfera. Se generaron curvas estándar usando duplicados de 25 µl de un estándar de la IgG₁ humana (Sigma, I5154) con series de dilución 1:3 (0,08-540 ng/ml). La detección se llevó a cabo usando 60 µl de anti-F(ab)₂ de la IgG humana de cabra marcado con R-PE (2,5 µg/ml; JIR 109-116-098, conjunto de elementos para conjugación de anticuerpos AbDSerotec Rapid RPE, LNK022RPE) y otra hora de tiempo de incubación (20 °C, 650 rpm). Las placas se analizaron usando un sistema Luminex[®] 200 (Millipore). Se contó un total de 100 esferas por pocillo en un volumen de muestra de 48 µl. Se usaron los valores de PE MFI para determinar la unión específica o no específica a las proteínas

recombinantes mencionadas precedentemente.

[00272] Según se muestra en las Figuras 1C y 1D, el anticuerpo AGEN1884 demostró una unión específica al CTLA-4 humano y de cinomolgo. No se observó una unión significativa a otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas enumeradas a las concentraciones evaluadas.

6.1.4 Unión del anticuerpo al CTLA-4 expresado por células T activadas

[00273] A continuación, se examinó la unión del AGEN1884w al CTLA-4 expresado sobre la superficie de células T humanas activadas. Se enriquecieron PBMC humanas aisladas mediante una separación por densidad en gradiente de Ficoll de placas leucoplaquetarias de donantes sanos (Research Blood Components, LLC) en células T CD4⁺ intactas usando esferas magnéticas (Stemcell Technologies). La población de células T CD4⁺ enriquecida se volvió a suspender luego en medio RPMI1640 suplementado con 10% de suero AB humano (Sigma) a 1×10^6 /ml. Se sembraron 1×10^5 células en 100 μ l en cada pocillo de placas de fondo plano de 96 pocillos recubiertas previamente con un anticuerpo anti-CD3 (3 μ g/ml, BD Biosciences) y un anticuerpo anti-CD28 (10 μ g/ml, BD Biosciences) y se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂. El día 5, se agruparon las células y se contaron usando el analizador Muse Cell (EMD Millipore). Se tiñeron 50.000 células con 100 μ l de AGEN1884w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y un control de isotipo de la IgG₁ diluidos en serie comenzando a 10 μ g/ml sobre placas de fondo redondo de 96 pocillos durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con 150 μ l de solución amortiguadora FACS y se tiñeron con 100 μ l de solución amortiguadora FACS que contiene 0,25 μ l de anticuerpo anti-kappa humana de ratón marcado con PE (Invitrogen) y 1 μ l de APC-CD4

(BD Bioscience) durante 30 minutos a 4 °C. Luego se lavaron las células dos veces y se volvieron a suspender en 100 µl de solución amortiguadora FACS. Las muestras se obtuvieron con un Sistema FACSCanto II (BD Biosciences). Se analizaron las intensidades de fluorescencia promedio (MFI) de PE en las células T CD4+ usando el software FlowJo (FlowJo, LLC). Según se muestra en la Figura 2A, el AGEN1884w se unió al CTLA-4 expresado sobre la superficie de células T CD4+ humanas activadas.

[00274] Se analizaron las características de unión del anticuerpo AGEN1884 al CTLA-4 de cinomolgo (*Macaca fascicularis*) mediante un análisis por citometría de flujo. Se activaron PBMC de cinomolgo (Biomedical Primate Research Centre, Los Países Bajos) aisladas mediante gradiente de Ficoll usando 8 µg/ml del anti-CD3 unido a placas (BD, 557052) y 0,1 µg/ml de anticuerpos anti-CD28 (eBioscience, Cat. 16-0289-85) en la presencia de 50 U/ml de IL-2 (BioLegend, 589106) durante 3 días en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 10 mM de HEPES y 1X de Pen/Strep-glutamina a 37 °C y 5% de CO₂. Después de la activación, las células se incubaron con un anticuerpo anti-CD8a (eBioscience, 9043-0087-120) diluido 1:100 en solución amortiguadora FACS (PBS con 2% de FBS) durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron luego dos veces con solución amortiguadora FACS y se aplicaron al procedimiento Cytofix/Cytoperm del conjunto de elementos BD Bioscience (51-2090KZ) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Se aplicaron diluciones en serie de 1:3 de 9 a 0,037 µg/ml de AGEN1884, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y un control de isotipo de la IgG₁ a las células. Las muestras se suspendieron en 200 µl de solución amortiguadora FACS y se analizaron usando el citómetro de

flujo FACS Diva (BD Biosciences). Cuando se usó para la tinción intracelular, el anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884 mostró unión a células T CD8⁺ de cinomolgo activadas (Figura 2B).

[00275] Además, se separaron alícuotas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de humanos, de mono cinomolgo (Indochino), de rata o de ratón en los pocillos de una placa para cultivo tisular de fondo redondo de 96 pocillos (1×10^5 células/pocillo) y se estimularon durante 4 días en RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 15 mM de HEPES, 100 IU/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 100 IU/ml de IL-2 (Peprotech) y 1 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA) (Roche) a 37 °C y 5% de CO₂. Después de la estimulación, las células se lavaron y se agregó 5% de suero AB humano inactivado por calor (Sigma-Aldrich) para bloquear los receptores Fc y prevenir una unión de anticuerpos no específicos. Las células se lavaron otra vez y se volvieron a suspender en 100 µl de un anticuerpo anti-CD4 conjugado con APC diluido (clon OKT4, GK15 o W3/25; Biolegend). Después de incubar durante 45 minutos en oscuridad, las células se lavaron tres veces y se permeabilizaron usando un juego de amortiguadores de tinción FoxP3/Factor de transcripción (eBioscience) según las instrucciones del proveedor. Después de la permeabilización, las células se incubaron con diluciones en serie del AGEN1884w marcado con fluorescencia (Pacific Blue™) o un anticuerpo de control de isotipo que varía en un rango de entre 0,00003 µg/ml y 10 µg/ml durante 45 minutos a 4 °C en oscuridad. Las células se lavaron dos veces antes del análisis por citometría de flujo usando un equipo Becton Dickinson LSRFortessa™. Los datos se analizaron usando el software FlowJo (Versión 10). Según se muestra en la Figura 2C, el anticuerpo

AGEN1884w se unió a células T CD4+ estimuladas con PHA humanas y de cinomolgo, pero no a células T de rata o de ratón.

6.1.5 Actividad de bloqueo de ligandos

[00276] Para determinar si los anticuerpos anti-CTLA-4 bloquean la unión de los ligandos CD80 y CD86, se realizó un establecimiento de ensayo de calificación usando tecnología de ordenamientos en suspensión (en la Figura 3A se muestra un esquema). Se agregaron 1200 esferas Luminex® en 5 µl de solución amortiguadora de ensayo (Luminex Corp, N° 14 LC10014-01) a cada pocillo de placas de semiárea de 96 pocillos (Corning, Inc., 3884). Las esferas se acoplaron con el antígeno CTLA-4 (rhCTLA-4-Fc, R&D, N° 7268-CT) mediante acoplamiento de aminos con el COOH de la superficie de las esferas. La reacción de acoplamiento se realizó usando 50 µg/ml del antígeno CTLA-4 y 1×10^7 esferas Luminex por ml. Se usó una química estándar de NHS éster para formar enlaces carbodiimida entre los grupos de amina primaria del antígeno y los grupos carboxilo sobre la superficie de la esfera (capítulo 3 de la Guía de Luminex Xmap).

[00277] El acoplamiento del antígeno para proteínas es un procedimiento de carbodiimida simple de dos pasos durante el cual los grupos carboxilo de las microesferas se activan primero con el reactivo EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3- dimetilaminopropil]carbodiimida) en la presencia de Sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) para formar un intermediario sulfo-NHS-éster. El intermediario reactivo se reemplaza luego por reacción con la amina primaria de la molécula blanco (anticuerpo, proteína o péptido) para formar un enlace amida covalente. Las esferas acopladas se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpos anti-CTLA-4 (concentraciones de entre 9000

ng/ml y 12 ng/ml en 25 μ l de solución amortiguadora de ensayo por pocillo antes de agregar las esferas) durante 1 hora a 20 °C y 650 rpm. Los anticuerpos anti-CTLA-4 evaluados eran AGEN1884, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y un anticuerpo de control de isotipo de la IgG₁. Posteriormente, se agregaron 30 μ l de CD80 (R&D Systems, N° 140-B1) o CD86 (R&D Systems, N° 141-B2) marcado con R-PE a una concentración de 1 nM a cada pocillo, dando un volumen de pocillo total de 60 μ l (1200 esferas por pocillo y una concentración final de 0,5 nM de CD80 o CD86 marcado). El marcado del ligando lo realizaron los inventores usando conjuntos de elementos para marcado con R-PE (AbDSerotec, conjunto de elementos para conjugación de anticuerpos LYNX Rapid RPE, LNK023RPE) de acuerdo con el protocolo del proveedor. Las placas se analizaron usando un sistema Luminex[®] 200 (Millipore). Se contaron 100 esferas por pocillo en un volumen de muestra de 50 μ l. El potencial de bloqueo del ligando se calculó usando los valores MFI de la señal no competitiva (100% de unión) del control de ligando solamente. Una señal detectable de PE era indicativa de la unión del ligando al antígeno. AGEN1884 inhibió la unión de CD80 (Figura 3B) y de CD86 (Figura 3C) al CTLA-4 con un valor estimado de IC₅₀ de 56 ng/ml.

[00278] A continuación, se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-CTLA-4 para bloquear la unión del CD80-Fc y CD86-Fc recombinantes al CTLA-4 expresado sobre la superficie celular. Brevemente, se incubaron células T (Jurkat) que expresan CTLA-4 con concentraciones crecientes de AGEN1884w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia o un anticuerpo de control de isotipo de la IgG₁ (0, 0,001, 0,004, 0,012, 0,037, 0,11, 0,33, 0,99 y 2,96 μ g/ml), seguido por una concentración fija (0,625 μ g/ml)

de CD80-Fc o CD86-Fc marcado con fluorescencia. El porcentaje de células unidas por CD80-Fc o CD86-Fc se determinó mediante citometría de flujo. Según se muestra en la Figura 3D, AGEN1884w y un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia inhibió la unión de CD80-Fc y CD86-Fc a células Jurkat que expresan CTLA-4.

[00279] Además, se examinó el anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884w por su capacidad para alterar los complejos preformados de CTLA-4 expresado sobre la superficie celular y el CD80 o CD86 recombinante. Brevemente, se incubaron células Jurkat manipuladas para expresar constitutivamente CTLA-4 sobre la superficie celular con CD80-Fc o CD86-Fc (R&D Systems) diluidos en serie (10 a 0,0002 µg/ml) durante 30 minutos a 4 °C en una placa de fondo redondo de 96 pocillos. Después del lavado, se agregó una concentración fija (67 nM) de AGEN1884w marcado con fluorescencia (PerCP-CY5,5) o un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y la placa se incubó durante 30 minutos a 4 °C. La placa se lavó nuevamente y las células se volvieron a suspender en 100 µl de 1% de paraformaldehído (Alfa Aear) en PBS. Las muestras se analizaron usando un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCanto™ y los datos se analizaron usando el software FlowJo (Versión 10). El anticuerpo AGEN1884w alteró los complejos preformados de CTLA-4 y CD80 o CD86 de una manera dependiente de la dosis (Figura 3E).

6.1.6 Efecto de los anticuerpos anti-CTLA-4 sobre células T humanas después de estimulación con la enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA)

[00280] Se evaluó la actividad funcional de los anticuerpos anti-CTLA-4 sobre las células T humanas primarias después de estimulación con la enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA). Se agregaron PBMC

crioconservadas (10^5 células/pocillo) en RPMI1640 suplementado con penicilina, estreptomycin y 10% de FBS (Hyclone) a placas de superficie NUNCLON delta de 96 pocillos (NUNC™). Las células se cultivaron en la presencia de concentraciones crecientes de anticuerpo de 3,2, 16, 80, 400, 2000, 10000 y 50000 ng/ml y 100 ng/ml de SEA (Toxin Technologies) durante 5 días a 37 °C, 5% de CO₂ y 97% de humedad. Los anticuerpos evaluados eran AGEN1884w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y un control de isotipo de la IgG₁. El sobrenadante clarificado se recolectó y se guardó a -80 °C hasta el momento del análisis. Los títulos de IL-2 fueron generados por electroquimioluminiscencia (MSD).

[00281] Según se muestra en la Figura 4A, AGEN1884w aumentó la producción de IL-2 por células T en la presencia de estimulación con SEA.

6.1.7 Efecto del anticuerpo anti-CTLA-4 sobre la línea celular con informante de IL-2-luciferasa

[00282] La actividad funcional del anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884w también se analizó usando un ensayo con el informante de IL-2-luciferasa. Brevemente, se manipuló una línea de células T humanas (Jurkat) que expresaba CD28 de manera endógena para que exprese constitutivamente CTLA-4 sobre la superficie celular y un gen informante de luciferasa dirigido por un promotor de IL-2. La línea de células Jurkat manipulada se cocultivó con una línea de células presentadoras de antígenos (Raji) que expresaba CD80 y CD86. El disparo (Señal 1) del receptor de células T (TCR) se logró con un anticuerpo anti-CD3 humano de ratón y un anticuerpo anti-IgG (H+L) de ratón de cabra; y la señalización (Señal 2) coestimulante fue provista en trans por CD80 y CD86 expresados sobre células Raji. La expresión de CD80 y CD86

sobre las células Raji se confirmó mediante citometría de flujo (Figura 4B). El entrecruzamiento del TCR sobre la línea de células T Jurkat desencadenó la expresión de IL-2 que conduce a la producción de luciferasa, un marcador sustituto para la activación de células T. El cocultivo de estas dos líneas celulares dio como resultado la unión del correceptor CTLA-4 (expresado sobre células Jurkat) inhibidor con sus ligandos naturales CD80 y CD86 (expresados sobre células Raji) inhibiendo la activación de las células T, demostrado por la falta de expresión de luciferasa. Esta inhibición se alivió luego de la adición de concentraciones crecientes de AGEN1884w (0 a 300 µg/ml) debido al bloqueo por AGEN1884w de la interacción de CTLA-4 con sus ligandos CD80 y CD86 y cambio de la interacción de estos ligandos con el correceptor CD28 coestimulante de células T. La expresión de la luciferasa se cuantificó usando el reactivo Bio-Glo™ y los datos resultantes se usaron para determinar los valores de respuesta máxima (magnitud de aumento con AGEN1884w en comparación con un anticuerpo de control de isotipo de la IgG₁).

[00283] Según se muestra en la Figura 4C, el anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884w liberó de manera dependiente de la dosis la inhibición mediada por CTLA-4 de células T en este ensayo con el informante de IL-2-luciferasa.

6.1.8 Falta de actividad agonista del anticuerpo anti-CTLA-4

[00284] Se evaluó el potencial del AGEN1884w para mediar en la señalización directa del CTLA-4. Se aislaron células T primarias humanas que expresan CD3 a partir de células mononucleares de sangre periférica usando el conjunto de elementos con microesferas de células T Miltenyi Pan y se cultivaron con un anticuerpo anti-CD3 unido a placas (clon SP34, 10 µg/ml)

para activar la señalización del TCR. Se incluyó AGEN1884w o un anticuerpo de control de isotipo de la IgG₁ en el contexto de la activación del TCR en formatos ya sea solubles o unidos a placas (0,003 a 50 µg/ml). Después de cuatro días en cultivo y una incubación final de 6 horas con Brefeldina A (BD GolgiPlug™), las células se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluoróculo contra marcadores del linaje de la superficie, que incluyen un anticuerpo anti-CD3 (APC Cy7, clon SP34), un anticuerpo anti-CD8 (PE Cy7, clon SK1) y un anticuerpo anti-CD4 (PercP Cy5.5, clon L200) seguido por permeabilización de las células con Cytofix-Cytoperm™ (Beckton Dickinson). Para la evaluación de la producción intracelular de citoquinas, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-IFN γ (Alexa flúor 647, clon B27) y un anticuerpo anti-TNF α (PE, clon Mab11). Las células para el análisis por citometría de flujo se obtuvieron usando FACSCanto II y los análisis de los datos se efectuaron con Flowjo Versión 10.

[00285] Las concentraciones crecientes del AGEN1884w soluble (Figura 4D) o unido a placas (Figura 4E) no tuvo impacto sobre el porcentaje de células T CD8⁺ IFN γ ⁺, en comparación con el anticuerpo de control de isotipo de la IgG₁. A concentraciones tan elevadas como 50 µg/ml, AGEN1884w no actuó como un anticuerpo CTLA-4 agonista.

6.1.9 Combinación con el anticuerpo anti-LAG-3 o el anticuerpo anti-PD-1

[00286] A continuación, se examinó el anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884w por su sinergia con un anticuerpo anti-LAG-3 antagonista o anticuerpos anti-PD-1 antagonistas usando PBMC estimuladas de manera subóptima con la enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA). Brevemente, se colocaron PBMC humanas crioconservadas (Research Blood Components) a

razón de 10^5 células/pocillo en RPMI1640 suplementado con Normocin™ (Invivogen N° ant-nr) y 10% de FBS inactivado por calor (Gibco, Invitrogen Corporation) en placas de superficie NUNCCLON delta de 96 pocillos (NUNC™). Las células se cultivaron con 100 ng/ml de SEA (Toxin Technologies) en la presencia de 10 µg/ml de AGEN1884w soluble o un control de isotipo de la IgG₁ junto con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-LAG-3 IgG₁, AGEN1746, Nivolumab (lote AAB5719, Myoderm), Pembrolizumab (lote 7002688300, Myoderm), un control de isotipo de la IgG₁ o un control de isotipo de la IgG₄ durante 5 días a 37 °C, 5% de CO₂ y 97% de humedad. Los anticuerpos evaluados y sus respectivas concentraciones se muestran en la Figura 4F. El anticuerpo anti-LAG-3 AGEN1746 utilizado en este ensayo se generó basado en las regiones variables del anticuerpo 25F7 provisto en la publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: US 2011/0150892 (incorporada en la presente a modo de referencia). El AGEN1746 comprende una cadena pesada con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 91 y una cadena liviana con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 92 (Tabla 8). Los sobrenadantes clarificados se recolectaron y se guardaron a -80 °C hasta el momento del análisis. La citoquina IL-2 se detectó usando AlphaLISA (Perkin Elmer). Se calcularon la media y la desviación estándar de la concentración de IL-2.

Tabla 8: Secuencias del anticuerpo anti-LAG-3 AGEN1746

SEQ ID N°	Descripción	Secuencia de aminoácidos
91	cadena pesada de AGEN1746	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDY YWNWIRQPPGKGLEWIGEINHNGNTNSNPSLK SRVTLSDTSKNQFSLKLRSVTAADTAVYYCAF GYSDYEYNWFDPPWGQGTTLVTSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS

		LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHT CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
92	cadena liviana de AGEN1746	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLA WYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQ GTNLEIKRSVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNREGC

[00287] Según se muestra en la Figura 4F, la combinación del anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884w con el anticuerpo anti-LAG-3 AGEN1746, el anticuerpo anti-PD-1 Nivolumab o el anticuerpo anti-PD-1 Pembrolizumab mejoró la producción de IL-2 por las PBMC estimuladas de manera subóptima con el superantígeno SEA en un tratamiento con agente simple.

6.2 Ejemplo 2: Comparación de los anticuerpos anti-CTLA-4 con la región constante de la IgG₁ o la IgG₂

[00288] En este ejemplo se convirtió, AGEN1884w, que es un anticuerpo de la IgG₁ humana, en un anticuerpo de la IgG₂ humana, AGEN2041w. El anticuerpo AGEN2041w comparte la misma región variable de la cadena pesada y la misma cadena liviana con el AGEN1884w pero comprende una región constante de la IgG₂ humana. El anticuerpo AGEN2041w comprende una cadena pesada con la secuencia de la SEQ ID N°: 94 y una cadena liviana con la secuencia de la SEQ ID N°: 13.

[00289] Además, también se evaluaron numerosos AGEN1884w con regiones Fc mutadas para examinar el impacto de la interacción de FcγR sobre la actividad antagonista de los anticuerpos anti-CTLA-4. El anticuerpo

AGEN1884w-N297A comprende una cadena pesada con la secuencia de la SEQ ID N°: 95 y una cadena liviana con la secuencia de la SEQ ID N°: 13. El anticuerpo AGEN1884w-S267E/L328F comprende una cadena pesada con la secuencia de la SEQ ID N°: 96 y una cadena liviana con la secuencia de la SEQ ID N°: 13. El anticuerpo AGEN1884w-S239D/A330L/I332E comprende una cadena pesada con la secuencia de la SEQ ID N°: 97 y una cadena liviana con la secuencia de la SEQ ID N°: 13. Todos los residuos se numeran de acuerdo con el sistema de numeración EU.

6.2.1 Unión, bloqueo de ligandos y análisis de la selectividad de los anticuerpos anti-CTLA-4 con una región constante de la IgG₂

[00290] La afinidad del anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN2041w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₂ de referencia se analizó mediante resonancia de plasmón superficial como se describió en la Sección 6.1.1. Los antígenos CTLA-4 evaluados eran el CTLA-4-Fc humano recombinante (R&D Systems, N° 7268-CT), el CTLA-4 humano recombinante (Sino Biological, N° 11159-H08H), el CTLA-4-Fc de cinomolgo recombinante (Sino Biological, N° 90213-C02H) y el CTLA-4 de cinomolgo recombinante (Sino Biological, N° 90213-C08H). Los valores de afinidad se enumeran en la Figura 5A.

[00291] A continuación, se analizó la unión de AGEN2041w a células Jurkat que sobreexpresan el CTLA-4 humano en un ensayo de citometría de flujo similar al ensayo descrito en la Sección 6.1.2. Brevemente, primero se tiñeron células Jurkat que sobreexpresan el CTLA-4 humano (Promega) con diluciones en serie de AGEN2041w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₂ de referencia o un control de isotipo de la IgG₂ y luego con el

anticuerpo anti-kappa humano de ratón conjugado con APC (Invitrogen). Las muestras se obtuvieron con un FACSCanto II (BD Biosciences) y las intensidades de fluorescencia promedio (MFI) se analizaron usando el software FlowJo (FlowJo, LLC). El AGEN2041w se unió a células Jurkat que sobreexpresan el CTLA-4 humano (Figura 5B).

[00292] Se examinó la actividad de bloqueo del ligando de AGEN2041w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₂ de referencia y un control de isotipo de la IgG₂ usando tecnología de ordenamientos en suspensión como se describió en la Sección 6.1.5. Según se muestra en la Figura 5C, el AGEN2041w inhibió la unión de CD80 y CD86 al CTLA-4.

[00293] Se comparó la selectividad de AGEN2041w y un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₂ de referencia con un anticuerpo de control de isotipo de la IgG₂ usando tecnología de ordenamientos en suspensión como se describió en la Sección 6.1.3. Según se muestra en las Figuras 5D y 5E, el AGEN2041w se une específicamente al CTLA-4 humano y de cinomolgo. No se observó una unión significativa a los miembros de familia relacionados (CD28, ICOS, BTLA y PD-1 humanos recombinantes; y PD-1 de cinomolgo recombinante).

6.2.2 Efecto de los anticuerpos anti-CTLA-4 con una región constante de la IgG₁ o la IgG₂ sobre células T humanas después de estimulación con la enterotoxina A de *Staphylococcus* (SEA)

[00294] Las actividades funcionales de anticuerpos anti-CTLA-4 AGEN1884w y AGEN2041w se evaluaron en un ensayo con PBMC primarias humanas para la inducción de IL-2. El ensayo se condujo como se describió en la Sección 6.1.6. Brevemente, se cultivaron PBMC humanas en la presencia

de concentraciones crecientes de anticuerpo de 0,016, 0,08, 0.4, 2,0, 10, 50 y 250 µg/ml y 100 ng/ml de SEA (Toxin Technologies) durante 5 días. Los anticuerpos evaluados eran los anticuerpos anti-CTLA-4 AGEN1884w y AGEN2041w, un control de isotipo de la IgG₁ y un control de isotipo de la IgG₂. El título de IL-2 se determinó mediante electroquimioluminiscencia (MSD).

[00295] Según se muestra en la Figura 6A, ambos AGEN1884w y AGEN2041w estimularon la producción de IL-2 después de la estimulación con SEA.

6.2.3 Efecto del anticuerpo anti-CTLA-4 con una región constante de la IgG₂ sobre la línea celular con informante de IL-2-luciferasa

[00296] A continuación, se evaluó la actividad funcional del anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN2041w usando un ensayo con informante de IL-2-luciferasa similar al que se describió precedentemente. Brevemente, se agregaron células T (Jurkat) manipuladas genéticamente para expresar el CTLA-4 de la superficie y un gen informante de luciferasa 3' con respecto a un promotor de IL-2 a pocillos que contienen concentraciones crecientes de AGEN2041w o un control de isotipo de la IgG₂. Subsiguientemente, se agregaron células Raji, que expresan CD80 y CD86 de manera engógena y que fueron manipuladas genéticamente para expresar un “activador de células T”, al cultivo celular. Un “activador de células T” es un receptor de la superficie celular comercial que se une a los receptores de células T (TCR) de una manera independiente del antígeno y conduce a la activación de células T. La estimulación de las TCR de la línea celular Jurkat manipulada genéticamente desencadena la expresión de IL-2 que conduce a la producción de luciferasa. La adición de AGEN2041w a este ensayo bloquea la unión del CTLA-4

(expresado sobre las células Jurkat) con sus ligandos naturales CD80 y CD86 (expresados sobre las células Raji), aumentando así la producción de luciferasa. Las concentraciones de luciferasa se cuantificaron usando Bio-Glo™ y los datos resultantes se usaron para determinar los valores de respuesta máxima (magnitud de aumento con AGEN2041w en comparación con la actividad basal de la luciferasa sin anticuerpos).

[00297] Según se muestra en la Figura 6B, las concentraciones crecientes de AGEN2041w dieron como resultado una activación mejorada de las células T de una manera dependiente de la dosis. Por el contrario, el control de isotipo de la IgG₂ no mejoró la expresión de la luciferasa aún a la concentración más alta evaluada.

6.2.4 Caracterización del AGEN1884w producido por un clon estable

[00298] En este ejemplo, se examinó el AGEN1884w producido por un clon 105 estable (AGEN1884w-105) por su unión a un CTLA-4 expresado sobre la superficie celular y por su actividad funcional en un ensayo con PBMC primarias humanas.

[00299] Se analizó la unión de AGEN1884w-105 a células Jurkat que sobreexpresan el CTLA-4 humano en un ensayo de citometría de flujo similar al ensayo descrito en la Sección 6.1.2. Brevemente, primero se tiñeron células Jurkat que sobreexpresan el CTLA-4 humano (Promega) con diluciones en serie de AGEN1884w-105, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₁ de referencia o un control de isotipo de la IgG₁ y luego con el anticuerpo anti-kappa humano de ratón conjugado con PE (Invitrogen). Las muestras se obtuvieron con un FACSCanto II (BD Biosciences) y las intensidades de fluorescencia promedio (MFI) se analizaron usando el software FlowJo (FlowJo,

LLC). El AGEN1884w-105 se unió a células Jurkat que sobreexpresan el CTLA-4 humano (Figura 7A).

[00300] Se examinó la capacidad de AGEN1884w-105 para inducir la producción de IL-2 en un ensayo similar al ensayo descrito en la Sección 6.1.6. Brevemente, se cultivaron PBMC humanas durante 5 días en la presencia de 100 ng/ml de SEA (Toxin Technologies) y 20 µg/ml de AGEN1884w-105, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia o un control de isotipo de la IgG₁. El título de IL-2 se determinó mediante electroquimioluminiscencia (MSD). Según se muestra en la Figura 7B, el AGEN1884w-105 indujo la producción de IL-2 después de la estimulación con SEA.

6.2.5 Unión de los anticuerpos anti-CTLA-4 a receptores de Fc gamma expresados sobre la superficie

[00301] La unión de los anticuerpos anti-CTLA-4 a FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIIA humanos expresados sobre la superficie de células CHO se midió mediante citometría de flujo. Brevemente, se transfectaron células CHO con ADNc que codifica el FcγRIIA^{H131}, el FcγRIIB o el FcγRIIIA^{V158} humanos, generando las siguientes líneas celulares CHO: rCHO-huFcγRIIA⁺, rCHO-huFcγRIIB⁺ y rCHO-huFcγRIIIA⁺. Se realizó la unión de una titulación de dosis de anticuerpos que variaba en un rango de 0,0056-1000 µg/ml y los anticuerpos primarios se detectaron con un anticuerpo secundario anti-F(ab') humano conjugado con ficoeritrina (PE) (Jackson Immune Research). Las muestras fueron evaluadas mediante citometría de flujo y se analizaron los valores de la intensidad de fluorescencia promedio (MFI) de PE y se usaron para generar curvas de unión. Los anticuerpos evaluados eran AGEN1884w,

AGEN2041w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y un anticuerpo de control de isotipo de la IgG₁. En este estudio se usó el AGEN1884w producido en dos medios de crecimiento diferentes: el medio de crecimiento CD FortiCHO™ de Life Technologies Inc./Thermo (AGEN1884w-FortiCHO) y el medio de crecimiento PowerCHO™ 2 de Lonza (AGEN1884w-PowerCHO). El anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia contiene un alotipo de la IgG₁ diferente del de AGEN1884w. El anticuerpo de control de isotipo de la IgG₁ solamente se evaluó a 1000 µg/ml.

[00302] Según se muestra en la Figura 8A, AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO y AGEN2041w mostraron una unión mejorada a células que expresan FcγRIIA^{H131} en comparación con el anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia. De manera similar, la unión de AGEN1884w-PowerCHO y AGEN1884w-FortiCHO a células que expresan FcγRIIB era más fuerte que la unión del anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia (Figura 8B). Todos los anticuerpos de la IgG₁, AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO y el anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₁ de referencia, se unieron de manera similar al FcγRIIA^{V158} expresado sobre la superficie celular (Figura 8C). El AGEN2041w mostró una unión más débil al FcγRIIB (Figura 8B) y al FcγRIIA^{V158} (Figura 8C) que los anticuerpos de la IgG₁.

6.2.6 Unión de los anticuerpos anti-CTLA-4 a receptores de Fc gamma recombinantes

[00303] La unión de los anticuerpos anti-CTLA-4, AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO, AGEN2041w y un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₁ de referencia, al FcγRIIA y FcγRIIA humanas se midió usando resonancia de plasmón superficial (BIAcore® 3000).

[00304] Para la unión a FcγRIIA, se aplicó el método de inmovilización directa a un chip CM5 usando química estándar de aminos. La proteína FcγRIIA-His humana recombinante se diluyó en una solución de acetato de sodio, pH 4,0, hasta una concentración de 10 µg/ml y se inmovilizó en las celdas de flujo 2 y 4 usando una inyección de 8 minutos a una velocidad de flujo de 5 µl/min. Las celdas de flujo 1 y 3, usadas como celdas de flujo de referencia, se acoplaron simuladamente, es decir, se corrieron los reactivos de acoplamiento de aminos sobre las celdas de flujo como en las celdas de flujo 2 y 4 sin FcγRIIA. El desempeño de las superficies con FcγRIIA inmovilizado se evaluó usando 1 mg/ml de Trastuzumab en solución amortiguadora de corrida de HBS-EP Biacore sobre cada celda de flujo para una inyección de 0,5 minutos a una velocidad de flujo de 100 µl/min.

[00305] Para la unión a FcγRIIIA, se empleó el método de captura con un anticuerpo anti-tetra His inmovilizado a un chip CM5. El anticuerpo anti-His de ratón se diluyó en una solución de acetato de sodio, pH 5,0, hasta una concentración de 10 µg/ml y se inmovilizó en las cuatro celdas de flujo usando una inyección de 5 minutos a una velocidad de flujo de 10 µl/min mediante la química estándar de aminos. La proteína FcγRIIIA-His humana recombinante se capturó sobre la superficie del chip mediante inyección de una solución de FcγRIIIA-His a una concentración de 1 µg/ml durante 2 minutos a una velocidad de flujo de 5 µl/min.

[00306] Todos los anticuerpos de prueba se intercambiaron con solución amortiguadora en solución amortiguadora de corrida Biacore antes del análisis. Las concentraciones de proteínas de las muestras con intercambio por solución amortiguadora y de las soluciones madre intermediarias se

determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm usando un espectrofotómetro Nanodrop 1000.

[00307] Cada muestra se analizó para una serie de concentraciones de 8 puntos que comenzó en 1000 µg/ml para una dilución al medio. Los datos se recolectaron y procesaron usando el software de Biacore control versión 4.1 y un software BIAevaluation versión 4,1. Las curvas de dosis-respuesta se ajustaron a un modelo logístico de cinco parámetros (5PL). Los factores ponderantes de la curva predeterminada utilizados eran:

$$[00308] \quad \text{Varianza} = 0,02 \times \text{respuesta (RU)}^{1.8}$$

[00309] También se analizaron los datos de unión usando StatLIA versión 3.2. El paralelismo se evaluó con la prueba de Chi cuadrado ($P < 0,01$) en StatLIA.

[00310] La respuesta promedio (unidad de resonancia) de AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO, AGEN2041w y un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia para el FcγRIIA humano y el FcγRIIIA humano se muestran en las Figuras 9A y 9B, respectivamente.

6.2.7 Efecto de los anticuerpos anti-CTLA-4 sobre la línea celular con el informante receptor IIIA de Fc gamma

[00311] Se evaluó la capacidad de AGEN1884w para unirse conjuntamente con el CTLA-4 y enviar señales por los receptores Fc gamma activadores usando una línea celular informante que expresa el receptor IIIA de Fc gamma (FcγRIIIA) (Promega) junto con células blanco (en la Figura 10A se muestra un esquema del ensayo). En este ensayo, se usaron células Jurkat que expresan CTLA-4 humanas como células blanco. Se usaron células Jurkat manipuladas que expresan FcγRIIIA de manera estable, ya sea la variante

V158 (gran afinidad) o la variante F158 (baja afinidad) y un elemento de respuesta NFAT que dirige la expresión de la luciferasa de luciérnaga, como células efectoras. El ensayo se condujo de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Brevemente, se mezclaron 25 µl de células blanco (25.000 células) que expresan CTLA-4 con 25 µl de anticuerpos diluidos en serie comenzando con 4 µg/ml en placas de fondo plano blancas de 96 pocillos. Luego se agregaron 150.000 células efectoras en 25 µl al pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante la noche. La unión del complejo de anticuerpo/antígeno, en donde el antígeno está sobre la superficie de las células blanco, a FcγRIIIA envía señales a la construcción de promotor/informante de las células efectoras y da como resultado la transcripción del gen de la luciferasa. Al día siguiente, las placas se retiraron del incubador y se dejaron enfriar durante 30 minutos. Se agregaron 75 µl de reactivo Bio-Glo a temperatura ambiente (Promega) a cada pocillo, se midió la luminescencia con un lector de placas EnVision Multimode (Perkin Elmer) y se registraron las unidades relativas de luminiscencia (RLU). Los anticuerpos evaluados eran AGEN1884w-105 o AGEN 1884w (AGEN1884w-105 para las Figuras 10B, 10C, 10F y 10G, y AGEN1884w para las Figuras 10D y 10E); AGEN1884w-N297A (Figuras 10F y 10G); AGEN2041w (Figuras 10D y 10E); un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₁ de referencia (Figuras 10B y 10C); y un anticuerpo de control de isotipo de la IgG1 (Figuras 10B-10G).

[00312] Cuando se unían a células que expresan CTLA-4, el anticuerpo de la IgG₁, AGEN1884w-105, activó tanto la variante FcγRIIIA V158 (Figura 10B) como la variante FcγRIIIA F158 (Figura 10C). Según lo previsto, el anticuerpo de la IgG₂, AGEN2041w, no emitió señales por el FcγRIIIA

(Figuras 10D y 10E). Para confirmar la especificidad de este ensayo con informante, se evaluó una variante silente para el receptor Fc (FcR) del AGEN1884w (AGEN1884w-N297A) en el mismo ensayo y este mutante tampoco envió señales por el FcγRIIIA (Figuras 10F y 10G).

6.2.8 Efecto de los anticuerpos anti-CTLA-4 sobre la línea celular con el informante receptor IIA de Fc gamma

[00313] A continuación, la capacidad de AGEN2041w de unir conjuntamente el CTLA-4 y la señal por FcγRIIA se evaluó usando una línea celular informante que expresa FcγRIIA (Promega) junto con células blanco (células Jurkat que expresan CTLA-4 humano). Se usaron células Jurkat que expresan FcγRIIA con el polimorfismo de gran afinidad 131 H/H y un elemento de respuesta NFAT, que dirige la expresión de la luciferasa de luciérnaga, como células efectoras. Brevemente, se mezclaron 25 µl de células blanco (6×10^6 células/ml) con 25 µl de anticuerpos diluidos en serie comenzando en 0,1 µg/ml en pocillos duplicados de placas de ensayo blancas de 96 pocillos. Los anticuerpos evaluados eran AGEN2041w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG₂ de referencia y un anticuerpo de control de isotipo de la IgG₂. Luego, se agregaron 25 µl de células efectoras (6×10^6 células/ml) a cada pocillo, lo que dio como resultado una relación 1:1 de efector a blanco. Las placas se incubaron por 20 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Después de esta incubación, se descongeló el reactivo de ensayo con luciferasa Bio-Glo (Promega) a temperatura ambiente y se agregaron 75 µl a cada pocillo. La luminiscencia se midió dentro de los 5-10 minutos, usando el lector de placas de múltiples marcas EnVision (PerkinElmer). Se restó la luminiscencia basal de cada lectura de muestras y se registraron unidades de luminiscencia relativas (RLU)

ajustadas.

[00314] Según se muestra en la Figura 11, cuando se unía a células que expresan CTLA-4, el anticuerpo de la IgG₂, AGEN2041w, activó el FcγRIIA^{H131}.

6.2.9 Efecto de la unión del receptor de Fc gamma sobre la actividad antagonista de anticuerpos anti-CTLA-4

[00315] En este ejemplo, se examinó el efecto de la unión del FcγR sobre la actividad antagonista de los anticuerpos anti-CTLA-4.

[00316] Primero, se comparó la unión de AGEN1884w-105 y AGEN1884w-N297A al CTLA-4 expresado sobre la superficie celular en un ensayo de citometría de flujo similar al ensayo descrito en la Sección 6.1.2. Brevemente, primero se tiñeron células Jurkat que sobreexpresan el CTLA-4 humano (Promega) con diluciones en serie de AGEN1884w-105, AGEN1884w-N297A o un control de isotipo de la IgG₁ y luego con el anticuerpo anti-kappa humano de ratón conjugado con PE (Invitrogen). Las muestras se obtuvieron con un FACSCanto II (BD Biosciences) y las intensidades de fluorescencia promedio (MFI) se analizaron usando el software FlowJo (FlowJo, LLC). El AGEN1884w-105 y el AGEN1884w-N297A se unieron a células Jurkat que sobreexpresan el CTLA-4 humano (Figura 12A).

[00317] A continuación, se evaluó la dependencia de la unión al receptor de Fc (FcR) para la actividad funcional *in vitro* en un ensayo similar al ensayo descrito en la Sección 6.1.6. Brevemente, se cultivaron PBMC humanas durante 5 días en la presencia de 100 ng/ml de SEA (Toxin Technologies) y 20 µg/ml de AGEN1884w-105, AGEN1884w-N297A o un control de isotipo de la IgG₁. El título de IL-2 se determinó mediante

electroquimioluminiscencia (MSD).

[00318] A pesar de la unión similar al CTLA-4 expresado sobre la superficie celular (Figura 12A), el AGEN1884w-N297A mostró una potenciación reducida de secreción de IL-2 en comparación con la de AGEN1884w-105 en el ensayo con PBMC primarias humanas (Figura 12B).

[00319] Como una evidencia adicional del requerimiento de la unión del FcR para las actividades funcionales, los anticuerpos anti-CTLA-4 fueron evaluados por su capacidad para inducir secreción de IL-2 en la presencia o ausencia de bloqueantes de FcR.

[00320] Se agregaron PBMC crioconservadas (10^5 células/pocillo) en RPMI1640 suplementado con penicilina, estreptomicina y 10% de FBS (Hyclone) a placas de superficie NUNCLON delta de 96 pocillos (NUNC™). Las células se cultivaron con 100 ng/ml de SEA (Toxin Technologies) y 10 µg/ml de anti-CTLA-4 de la IgG₁ anticuerpo o human IgG₁ control de isotipo, en la presencia o ausencia de bloqueantes de FcR durante 5 días a 37 °C, 5% de CO₂ y 97% de humedad. Los anticuerpos anti-CTLA-4 evaluados eran un anticuerpo de la IgG₁ de referencia (Figura 13A) y AGEN1884w-105 (Figura 13B). Los bloqueantes de FcR eran los anticuerpos anti-CD16 (Biolegend N°302013), anti-CD32 (R&D N° AF1330) y anti-CD64 (R&D N°AF1257) (10 µg/ml de cada uno) (Figura 13A) o el anticuerpo anti-CD32 (eBiosciences N° 16-0329-81) solo (Figura 13B). En los grupos control de la Figura 13B, el AGEN1884w-105 y el control de isotipo de la IgG₁ humana también se incubaron con un control de isotipo de la IgG₁ de ratón (Biolegend N°400124) como se indica en la figura. El sobrenadante clarificado se recolectó y se guardó a -80 °C hasta el momento del análisis. Los títulos de IL-2 fueron

generados por electroquimioluminiscencia (MSD).

[00321] El bloqueo de FcR, usando anticuerpos contra CD16, CD32 y CD64 (Figura 13A) o usando un anticuerpo contra CD32 (Figura 13B), disminuyó la capacidad de los anticuerpos anti-CTLA-4 para inducir secreción de la IL-2 en este ensayo con PBMC primarias humanas.

[00322] A continuación, se evaluó la actividad funcional de numerosos anticuerpos anti-CTLA-4 con regiones Fc mutadas usando PBMC. Brevemente, se colocaron PBMC humanas crioconservadas (Research Blood Components) a razón de 10^5 células/pocillo en RPMI1640 suplementado con Normocin™ (Invivogen) y 10% de FBS inactivado por calor (Gibco, Invitrogen Corporation) en placas de superficie NUNCLON delta de 96 pocillos (NUNC™). Las células se cultivaron durante 5 días a 37 °C, 5% de CO₂ y 97% de humedad en la presencia de 142 ng/ml de SEA (Toxin Technologies) y 10 µg/ml de AGEN1884w, AGEN1884w-N297A, AGEN1884w-S267E/L328F, AGEN1884w-S239D/A330L/I332E, AGEN2041w, un anticuerpo de control de isotipo de la IgG1 o un anticuerpo de control de isotipo de la IgG₂. El sobrenadante clarificado se recolectó y se guardó a -80 °C hasta el momento del análisis. Las concentraciones de IL-2 se midieron mediante un ELISA.

[00323] El AGEN1884w con la mutación triple S239D/A330L/I332E en la región Fc, que mejora la unión al FcγRIIIA, estimuló más secreción de IL-2 que el AGEN1884w con la región Fc de IgG₁ de tipo salvaje (Figura 14).

6.2.10 Potencial de células efectoras mediadas por Fc

[00324] En este ejemplo, se analizó el anticuerpo AGEN1884w por su capacidad para mediar la citotoxicidad de células NK. Brevemente, se cultivaron células Jurkat manipuladas para expresar constitutivamente el CTLA-

4 sobre la superficie celular (células blanco) a 1×10^4 células/pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos. Se agregaron concentraciones crecientes de AGEN1884w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia o un anticuerpo de control de isotipo (todos entre 0 y 10 $\mu\text{g/ml}$) y 5×10^4 células NK92-FcyRIIIA (células efectoras) a las células blanco. Después de incubar durante 6 horas a 37 °C y 5% de CO_2 , se evaluó la lisis de las células blanco mediante cuantificación fotométrica de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el sobrenadante usando un conjunto de elementos para detección de citotoxicidad (LDH) (Roche) según las instrucciones del proveedor. Los datos se obtuvieron usando un software de adquisición y análisis de datos de microplacas SoftMax® Pro. Todas las concentraciones de anticuerpo fueron evaluadas por triplicado.

[00325] Según se muestra en la Figura 15, el anticuerpo AGEN1884w medió eficazmente la lisis de las células blanco que expresan CTLA-4 en la presencia de células efectoras.

6.2.11 Mapeo de epitopes del anticuerpo anti-CTLA-4

[00326] Se estudió la interacción del fragmento Fab de AGEN1884w (AGEN1884w-Fab) con el dominio extracelular del CTLA-4 humano mediante espectrometría de masas con intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX). Se diluyó el dominio extracelular del CTLA-4 solo o en combinación con AGEN1884w-Fab, en solución amortiguadora salina de fosfato a pH 7,4, con un volumen 10X de solución amortiguadora de marcado con óxido de deuterio y se incubó por períodos de tiempo variables (0, 60, 300, 1800 y 7200 segundos) a temperatura ambiente. El intercambio de deuterio por hidrógeno se detuvo por adición de un volumen de 4 M de clorhidrato de

guanidina, 0,85 M de solución amortiguadora de TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) y el pH final era de 2,5. Las muestras fueron sometidas luego a digestión en-columna con pepsin/proteasa tipo XIII y análisis por LC-MS. Los espectros de masa se registraron en la modalidad de MS solo. Para calcular la incorporación de deuterio, se combinaron los espectros de masa para un péptido dado por el pico del cromatograma de ion extraído y se calculó el m/z promedio ponderado. El aumento de masa desde la masa del péptido nativo (0 minuto) hasta la masa promedio ponderada corresponde al nivel de incorporación de deuterio. Las curvas de acumulación de deuterio durante el tiempo de intercambio de todos los péptidos se graficaron para un análisis adicional y se compararon con el software HDEaminer.

[00327] La mayoría de los péptidos CTLA-4 presentó niveles de deuterio idénticos o similares con y sin el anti-Fab CTLA-4 humano. Sin embargo, se encontró que varios segmentos de péptido mostraron una incorporación significativamente menor de deuterio luego de la unión a Fab. Todos los residuos mencionados en este párrafo se numeran de acuerdo con la SEQ ID N°: 77. Dos regiones, Q⁸⁰VT⁸² (SEQ ID N°: 78) y Y¹³⁵PPYYLGIGNGTQI¹⁴⁹ (SEQ ID N°: 79), experimentaron una fuerte protección contra deuterio cuando el CTLA-4 humano estaba unido al Fab. La disminución más fuerte en la captación de deuterio se observó en Y¹⁴⁰L¹⁴¹, que por lo tanto aparentemente era un rasgo fundamental del epítopo de AGEN1884w en el CTLA-4. La inspección de las secuencias del CTLA-4 humano y de mono cinomolgo, a las cuales AGEN1884w se une fuertemente, revela una identidad de secuencia casi completa en las dos regiones descritas previamente, excepto por una sustitución de metionina por leucina en la

posición 141 (Figura 17A). Por el contrario, AGEN1884w no se une hasta un grado significativo al CTLA-4 de ratón o de rata (no se muestran los datos) que difiere del CTLA-4 humano en Y¹⁴⁰LGI¹⁴³ (SEQ ID N°: 80) en tres de cuatro posiciones (Figura 17A). Otros datos de selectividad muestran que el AGEN1884w se une con gran especificidad al CTLA-4 humano y de mono cinomolgo y no a los miembros relacionados de la familia CD28, que incluyen CD28, ICOS, BTLA y PD-1 (no se muestran los datos). La comparación de secuencias entre estas proteínas relacionadas muestra que todas las proteínas no-CTLA-4 difieren en la secuencia Y¹⁴⁰LGI¹⁴³ (SEQ ID N°: 80) (Figura 17B), lo que ofrece un soporte adicional de la importancia de este epítopo para la unión de AGEN1884w.

6.2.12 Estudio de la respuesta del anticuerpo dependiente de células T (TDAR) en monos cinomolgo

[00328] Se condujo un estudio TDAR de ocho semanas en monos cinomolgo para examinar la capacidad de AGEN1884w y AGEN2041w para potenciar las respuestas de anticuerpo dependientes de células T a una vacuna contra la Hepatitis B (ENERIX-G[®]) (HBsAg). La vacuna HBsAg se administró en tres inyecciones subcutáneas a razón de 10 µg por inyección (30 µg en total) en la pata posterior el Día 1 (imprimación) y el Día 29 (refuerzo). Se administró AGEN1884w (N = 6) o AGEN2041w (N = 6) dos veces mediante inyección de bolo intravenoso (10 mg/kg) el Día 1 y el Día 29, junto con los antígenos de vacuna. Con el mismo programa de dosificación, a un grupo de animales control (N = 3) se le administró la vacuna HBsAg en combinación con 3 mg/kg de un anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia y otro grupo de animales control (N = 6) recibió HBsAg con el artículo de control: 20 mM de tris

clorhidrato, 100 mM de NaCl, 1% de manitol, 0,10 mM de DTPA, 0,01% de polisorbato 80, pH 7,0, pero no el anticuerpo anti-CTLA-4. Durante el estudio de ocho semanas, se condujeron análisis anti-HBsAg (IgG) con muestras de suero recolectadas en determinados puntos de tiempo durante el estudio (Día -20, -7, Día +15, +29, +43, +59 y +69). Los títulos del suero se midieron mediante un ensayo de ELISA colorimétrico.

[00329] Los animales que recibieron AGEN1884w, AGEN2041w, el anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia o el artículo de control mostraron respuestas anamnésicas normales con títulos de anticuerpo medibles después de la segunda dosis de vacuna, que presentaron un pico luego de lo cual disminuyeron (Figuras 18A y 18B). Sin embargo, se mostró que AGEN1884w, AGEN2041w y el anticuerpo anti-CTLA-4 de la IgG1 de referencia mejoran la respuesta anti-HBsAg IgG frente al artículo de control administrado en la ausencia de un anticuerpo anti-CTLA-4.

6.3 Ejemplo 3: Caracterización de los anticuerpos anti-CTLA-4

[00330] En este ejemplo, se caracterizaron los siguientes 19 anticuerpos anti-CTLA-4 por su unión y bloqueo del ligando: AGEN1884, AGEN1885, AGEN1886, AGEN1887, AGEN1888, AGEN1889, AGEN1890, AGEN1891, AGEN1892, AGEN1893, AGEN1894, AGEN1895, AGEN1896, AGEN1897, AGEN1898, AGEN1899, AGEN1900, AGEN1901 y AGEN1902. Las secuencias de la cadena pesada variable y la cadena liviana variable de estos anticuerpos se divulgaron en la Tabla 6. En las Figuras 19A y 19B se muestran alineamientos de secuencias de las cadenas pesadas variables y de las cadenas livianas variables, respectivamente.

6.3.1 Análisis de la unión y bloqueo de ligandos de los anticuerpos anti-

CTLA-4

[00331] Se analizó la afinidad de los 19 anticuerpos anti-CTLA-4 descritos previamente mediante resonancia de plasmón superficial en un ensayo similar al descrito en la Sección 6.1.1. El antígeno CTLA-4 evaluado era el CTLA-4-Fc humano recombinante (R&D Systems, N° 7268-CT). Los anticuerpos anti-CTLA-4 (6 µg/ml en solución amortiguadora de corrida) se capturaron sobre la superficie de chip de un chip sensor CM5. Los 19 anticuerpos se unieron al CTLA-4 humano recombinante con una afinidad nM (no se muestran los datos).

[00332] La actividad de bloqueo de ligandos de los 19 anticuerpos anti-CTLA-4 se examinó usando tecnología de ordenamientos en suspensión en un ensayo similar al descrito en la Sección 6.1.5. El bloqueo de ligandos se evaluó en la presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos anti-CTLA-4 (3.000 ng/ml a 12 ng/ml antes de agregar las esferas). Según se muestra en las Figuras 20A-20E, los 19 anticuerpos anti-CTLA-4 bloquearon la unión de CTLA-4 a CD80 y CD86.

[00333] El alcance de la invención no está limitado por las realizaciones específicas descritas en la presente. Aún más, varias modificaciones de la invención además de las descritas en la presente serán evidentes para los especialistas en el arte a partir de la descripción precedente y las figuras adjuntas. Se considera que dichas modificaciones se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

[00334] Todas las referencias (por ejemplo, las publicaciones o las patentes o las solicitudes de patente) citadas en la presente se incorporan por completo aquí como referencia y para todo fin en la misma extensión que si se

indicara la incorporación de cada referencia (por ejemplo, publicación o patente o solicitud de patente) específicamente e individualmente por completo a modo de referencia para todo fin. Otras formas de realización están incluidas en las reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AGENUS INC.

<120> ANTICUERPOS ANTI-CTLA-4 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> 581170:AGBW-004PC

<140>

<141>

<150> 62/168,391

<151> 2015-05-29

<150> 62/182,363

<151> 2015-06-19

<150> 62/190,653

<151> 2015-07-09

<150> 62/257,202

<151> 2015-11-18

<150> 62/280,263

<151> 2016-01-19

<150> 62/292,500

<151> 2016-02-08

<150> 62/294,558

<151> 2016-02-12

<150> 62/323,226

<151> 2016-04-15

<160> 97

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 1

Ser Tyr Ser Met Asn

1

5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 2

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 3

Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr Leu Gly

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 5

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 6

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

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

<210> 9

<211> 98

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 9

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg

<210> 10

<211> 96

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1	5	10	15												
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Ser	Ser
	20						25						30		
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu
	35						40						45		
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
	50						55						60		
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu
65							70								80
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro
					85					90				95	

<210> 11

<211> 96

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 11

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

<210> 12

<211> 448

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 12

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

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

115

120

125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130

135

140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

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

245

250

255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260

265

270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275

280

285

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

290

295

300

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

305

310

315

320

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

325

330

335

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

340

345

350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 13

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 14

<211> 444

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys

210

215

220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

225

230

235

240

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

245

250

255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe

260

265

270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

275

280

285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr

290

295

300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr

325 330 335

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

340 345 350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser

385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 15

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Val Ala Ala

100

105

110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115

120

125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130

135

140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145

150

155

160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 16

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 17

Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile

1 5

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 18

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile

1

5

10

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 19

Gln Ser Val Ser Arg Tyr

1 5

<210> 20

<211> 3

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 20

Gly Ala Ser

1

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 21

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<220>

<221> VARIANT

<222> (3) .. (3)

<220>

<221> VARIANT

<222> (5) .. (5)

<220>

<221> VARIANT

<222> (5) .. (5)

<223> can be Asn or Ser

<400> 22

Ser Tyr Xaa Met Xaa

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<220>

<221> VARIANT

<222> (8) .. (8)

<223> can be Asp or Asn

<400> 23

Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Xaa Ile

1 5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<220>

<221> VARIANT

<222> (7) .. (7)

<223> can be Ser or Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (8) .. (8)

<223> can be Arg, Ser or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (11) .. (11)

<223> can be Gly or Ala

<400> 24

Arg Ala Ser Gln Ser Val Xaa Xaa Tyr Leu Xaa

1

5

10

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<220>

<221> VARIANT

<222> (1) .. (1)

<223> can be Gly or Ala

<220>

<221> VARIANT

<222> (2) .. (2)

<223> can be Ala or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (4) .. (4)

<223> can be Thr, Ser, Arg or Asn

<400> 25

Xaa Xaa Ser Xaa Arg Ala Thr

1

5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<220>

<221> VARIANT

<222> (5) .. (5)

<223> can be Ser or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> can be Trp or Phe

<400> 26

Gln Gln Tyr Gly Xaa Ser Pro Xaa Thr

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 27

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 28

Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asn Ile

1

5

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 31

Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr

1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 32

Ala Thr Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 33

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 34

Ala Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 35

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 36

Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 37

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Thr

1 5

<210> 38

<211> 118

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 38

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 39

<211> 118

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 39

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 40

<211> 118

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 40

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 41

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val

35

40

45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 42

<211> 118

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 42

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 43

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Val Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 44

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Val Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 45

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Phe Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100

105

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 46

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1

5

10

15

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

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ala Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 47

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100

105

<210> 48

<211> 30

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20

25

30

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 49

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser

1 5 10

<210> 50

<211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 50

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 51

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

<210> 52

<211> 30

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 52

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser

20 25 30

<210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 53

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val Ser

1 5 10

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 54

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1

5

10

15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

25

30

<210> 55

<211> 30

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 55

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 56

<211> 30

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 56

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

<210> 57

<211> 23

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 57

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 58

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 59

<211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 59

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 60

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1

5

10

<210> 61

<211> 23

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 61

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 62

Trp Tyr Gln His Lys Val Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 63

<211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 63

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 64

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 65

<211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 65

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

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 66

<211> 23

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 66

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Phe Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 67

<211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 67

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 68

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
1 5 10

<210> 69

<211> 23

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 69

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 70

<211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 70

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 71

<211> 32

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 71

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1

5

10

15

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

20

25

30

<210> 72

<211> 118

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<220>

<221> VARIANT

<222> (5) .. (5)

<223> can be Val or Leu

<220>

<221> VARIANT

<222> (13) .. (13)

<223> can be Lys or Gln

<220>

<221> VARIANT

<222> (19) .. (19)

<223> can be Arg or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (33) .. (33)

<223> can be Ser or Ala

<220>

<221> VARIANT

<222> (35) .. (35)

<223> can be Asn or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (46) .. (46)

<223> can be Glu or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (78) .. (78)

<223> can be Ser or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (106) .. (106)

<223> can be Asp or Asn

<400> 72

Glu Val Gln Leu Xaa Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Xaa Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Xaa Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Xaa Met Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Xaa Trp Val

35

40

45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Xaa Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Xaa Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Met Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 73

<211> 107

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<220>

<221> VARIANT

<222> (9) .. (9)

<223> can be Gly or Ala

<220>

<221> VARIANT

<222> (13) .. (13)

<223> can be Leu, Val or Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> (30) .. (30)

<223> can be Ser or Gly

<220>

<221> VARIANT

<222> (31) .. (31)

<223> can be Arg, Thr or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (34) .. (34)

<223> can be Gly or Ala

<220>

<221> VARIANT

<222> (38) .. (38)

<223> can be Gln or His

<220>

<221> VARIANT

<222> (40) .. (40)

<223> can be Pro or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> (45) .. (45)

<223> can be Arg or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (50) .. (50)

<223> can be Gly or Ala

<220>

<221> VARIANT

<222> (51) .. (51)

<223> can be Ala or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (53) .. (53)

<223> can be Thr, Arg, Ser or Asn

<220>

<221> VARIANT

<222> (60) .. (60)

<223> can be Asp or Ala

<220>

<221> VARIANT

<222> (66) .. (66)

<223> can be Gly, Val or Ala

<220>

<221> VARIANT

<222> (73) .. (73)

<223> can be Leu or Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> (76) .. (76)

<223> can be Thr or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (77) .. (77)

<223> can be Arg or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> (93) .. (93)

<223> can be Ser or Thr

<220>

<221> VARIANT

<222> (96) .. (96)

<223> can be Trp or Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> (100)..(100)

<223> can be Gln or Pro

<220>

<221> VARIANT

<222> (105)..(105)

<223> can be Glu or Asp

<400> 73

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Xaa Thr Leu Ser Xaa Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Xaa Xaa Tyr

20 25 30

Leu Xaa Trp Tyr Gln Xaa Lys Xaa Gly Gln Ala Pro Xaa Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Xaa Xaa Ser Xaa Arg Ala Thr Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Xaa Ser Gly Thr Asp Phe Thr Xaa Thr Ile Xaa Xaa Leu Glu Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Xaa Ser Pro Xaa

85

90

95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Val Xaa Ile Lys

100

105

<210> 74

<211> 448

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 74

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210

215

220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225

230

235

240

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

245

250

255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260

265

270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275

280

285

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

290

295

300

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

305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400

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

405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 75

<211> 448

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 75

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

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

115

120

125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130

135

140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145

150

155

160

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

165

170

175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180

185

190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195

200

205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210

215

220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225 230 235 240

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

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro

260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

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

435

440

445

<210> 76

<211> 448

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 76

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

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

115

120

125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130

135

140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp

225 230 235 240

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

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

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

355

360

365

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

370

375

380

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

385

390

395

400

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

405

410

415

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

420

425

430

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

435

440

445

<210> 77

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
35 40 45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
50 55 60

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr

85

90

95

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

100

105

110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile

115

120

125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly

130

135

140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser

145

150

155

160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe

165

170

175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys

180

185

190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu

195

200

205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn

210

215

220

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Gln Val Thr

1

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

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

1 5 10 15

<210> 80

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Tyr Leu Gly Ile

1

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile

1 5

<210> 83

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

1 5 10

<210> 84

<211> 223

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 84

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Arg Leu Asn Leu Ala

1 5 10 15

Thr Arg Thr Arg Pro Tyr Thr Leu Leu Phe Ser Leu Leu Phe Ile Pro

20 25 30

Val Phe Ser Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala

35 40 45

Asn Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Met Gly Ile Gly
130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys

180

185

190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu

195

200

205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn

210

215

220

<210> 85

<211> 223

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 85

Met Ala Cys Leu Gly Leu Arg Arg Tyr Lys Ala Gln Leu Gln Leu Pro

1

5

10

15

Ser Arg Thr Trp Pro Phe Val Ala Leu Leu Thr Leu Leu Phe Ile Pro

20

25

30

Val Phe Ser Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val Val Leu Ala
35 40 45

Ser Ser His Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ser Pro Ser His
50 55 60

Asn Thr Asp Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr Asn Asp Gln
65 70 75 80

Met Thr Glu Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Glu Lys Asn Thr Val Gly
85 90 95

Phe Leu Asp Tyr Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu Ser Arg Val
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Leu
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly

130

135

140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser

145

150

155

160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Val Ala Val Ser Leu Gly Leu Phe Phe

165

170

175

Tyr Ser Phe Leu Val Ser Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys

180

185

190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu

195

200

205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn

210

215

220

<210> 86

<211> 223

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 86

Met Ala Cys Leu Gly Leu Gln Arg Tyr Lys Thr His Leu Gln Leu Pro

1 5 10 15

Ser Arg Thr Trp Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser Leu Leu Phe Ile Pro

20 25 30

Ile Phe Ser Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val Val Leu Ala

35 40 45

Ser Ser His Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ala Ser Ser His

50 55 60

Asn Thr Asp Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr Asn Asp Gln

65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Val Lys Asn Thr Leu Gly

85

90

95

Phe Leu Asp Asp Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu Ser Arg Val

100

105

110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Phe

115

120

125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly

130

135

140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser

145

150

155

160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe

165

170

175

Tyr Ser Phe Leu Val Thr Ala Val Ser Leu Asn Arg Thr Leu Lys Lys

180

185

190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu

195

200

205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn

210

215

220

<210> 87

<211> 220

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val

1

5

10

15

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr

20

25

30

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser

35

40

45

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu

50

55

60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser

65

70

75

80

Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr

85

90

95

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys

100

105

110

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser

115

120

125

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro

130

135

140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly

145

150

155

160

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

165

170

175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met

180

185

190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro

195

200

205

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

210

215

220

<210> 88

<211> 199

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys

1 5 10 15

Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile

20 25 30

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

35 40 45

Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85

90

95

Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser

100

105

110

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

115

120

125

His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro

130

135

140

Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu

145

150

155

160

Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro

165

170

175

Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser

180

185

190

Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu

195

<210> 89

<211> 289

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Met Lys Thr Leu Pro Ala Met Leu Gly Thr Gly Lys Leu Phe Trp Val

1 5 10 15

Phe Phe Leu Ile Pro Tyr Leu Asp Ile Trp Asn Ile His Gly Lys Glu

20 25 30

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

35 40 45

Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr Cys Ala

50

55

60

Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr Cys Val

65

70

75

80

Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn Ile Ser

85

90

95

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

100

105

110

Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser

115

120

125

Thr Thr Leu Tyr Val Thr Asp Val Lys Ser Ala Ser Glu Arg Pro Ser

130

135

140

Lys Asp Glu Met Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Arg Leu Leu Pro

145

150

155

160

Leu Gly Gly Leu Pro Leu Leu Ile Thr Thr Cys Phe Cys Leu Phe Cys

165

170

175

Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala

180

185

190

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

195

200

205

Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr Gly

210

215

220

Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly Ser

225

230

235

240

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

245

250

255

Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu Ala
260 265 270

Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val Arg
275 280 285

Ser

<210> 90

<211> 288

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp

35

40

45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val

50

55

60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala

65

70

75

80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg

85

90

95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

100

105

110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu

115

120

125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val

130

135

140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro

145

150

155

160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly

165

170

175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys

180

185

190

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

195

200

205

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

210

215

220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro

225

230

235

240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly

245

250

255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg

260

265

270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu

275

280

285

<210> 91

<211> 449

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 91

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

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

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val

165

170

175

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

180

185

190

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

195

200

205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

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

325

330

335

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

340

345

350

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

355

360

365

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

370

375

380

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

385

390

395

400

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

405

410

415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420

425

430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435

440

445

Gly

<210> 92

<211> 214

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 92

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50

55

60

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

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Ser Val Ala Ala

100

105

110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser

175

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

190

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

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 93

<211> 447

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 93

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

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

165

170

175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180

185

190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195

200

205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210

215

220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225

230

235

240

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

245

250

255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 94

<211> 443

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 94

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

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

115

120

125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

130

135

140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145

150

155

160

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

165

170

175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180

185

190

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser

195

200

205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys

210

215

220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

225

230

235

240

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

245

250

255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe

260

265

270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro

275

280

285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr

290

295

300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val

305

310

315

320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr

325

330

335

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

340

345

350

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

355

360

365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

370

375

380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 95

<211> 447

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 95

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100	105	110	
Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
115	120	125	
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly			
130	135	140	
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			
145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
165	170	175	
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
180	185	190	
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
195	200	205	

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210

215

220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225

230

235

240

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

245

250

255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260

265

270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275

280

285

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

290

295

300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

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

420

425

430

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

435

440

445

<210> 96

<211> 447

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> se obtuvo de una biblioteca sintética

<400> 96

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

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

115

120

125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130

135

140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145

150

155

160

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

165

170

175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180

185

190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195

200

205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210

215

220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

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

340

345

350

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

355

360

365

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

370

375

380

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

385

390

395

400

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

405

410

415

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

420

425

430

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

435

440

445

<210> 97

<211> 447

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> btained from a synthetic library

<400> 97

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

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

115

120

125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130

135

140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp
 225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

260

265

270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

275

280

285

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

290

295

300

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

305

310

315

320

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

325

330

335

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

340

345

350

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

355

360

365

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

370

375

380

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

385

390

395

400

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

405

410

415

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

420

425

430

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

435

440

445

REIVINDICACIONES:

1. Un anticuerpo aislado, CARACTERIZADO PORQUE se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

(a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos SYX₁MX₂ (SEQ ID N°: 22), en donde

X₁ es S o A; y

X₂ es N o S;

(b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos SSSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID N°: 2);

(c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos VGLMGPFXI (SEQ ID N°: 23), en donde

X es D o N;

(d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID N°: 24), en donde:

X₁ es S o G;

X₂ es R, S o T; y

X₃ es G o A;

(e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID N°: 25), en donde:

X₁ es G o A;

X₂ es A o T; y

X_3 es T, S, R o N; y

(f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYGX₁SPX₂T (SEQ ID N°: 26), en donde:

X_1 es S o T; y

X_2 es W o F.

2. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE CDRH1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 1 y 27.

3. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO PORQUE CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 3 y 28

4. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, CARACTERIZADO PORQUE CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 4, 29 y 30.

5. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, CARACTERIZADO PORQUE CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 5 y 31-35.

6. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, CARACTERIZADO PORQUE CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 6, 36 y 37.

7. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, CARACTERIZADO PORQUE las CDRH1, CDRH2 y CDRH3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente, ilustradas en las SEQ ID N°: 1, 2 y 3; 27, 2 y 3; o 27, 2 y 28.

8. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-7,

CARACTERIZADO PORQUE las CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos de las CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente, ilustradas en las SEQ ID N°: 4, 5 y 6; 29, 32 y 36; 29, 33 y 37; 30, 31 y 6; 29, 34 y 6; o 29, 35 y 37.

9. Un anticuerpo aislado, CARACTERIZADO PORQUE se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde las CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos ilustradas en las SEQ ID N°: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

10. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 72.

11. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95% o un 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 7 y 38-42.

12. El anticuerpo aislado de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 7 y 38-42.

13. El anticuerpo aislado de la reivindicación 12, CARACTERIZADO PORQUE la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7.

14. El anticuerpo aislado de la reivindicación 13, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 12.

15. El anticuerpo aislado de la reivindicación 13, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 93.

16. El anticuerpo aislado de la reivindicación 13, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14.

17. El anticuerpo aislado de la reivindicación 13, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 94.

18. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de línea germinal de la IGHV3-21 humana.

19. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 73.

20. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región variable de

la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 75%, un 80%, un 85%, un 90%, un 95% o un 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 8 y 43-47.

21. El anticuerpo aislado de la reivindicación 20, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 8 y 43-47.

22. El anticuerpo aislado de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8.

23. El anticuerpo aislado de la reivindicación 22, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13.

24. El anticuerpo aislado de la reivindicación 22, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 15.

25. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de línea germinal de la IGKV3-20 humana o una secuencia de línea germinal de la IGKV3-11 humana.

26. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena liviana, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos

ilustradas en las SEQ ID N°: 7 y 8; 7 y 44; 7 y 45; 38 y 8; 38 y 45; 39 y 43; 39 y 45; 39 y 46; 39 y 47; 40 y 43; 40 y 8; 40 y 44; 40 y 45; 41 y 8; 41 y 44; 41 y 45; 41 y 47; 42 y 43; o 42 y 45.

27. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 7; y

(b) una región variable de la cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 8.

28. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, CARACTERIZADO PORQUE comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 7 y 38-42.

29. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, CARACTERIZADO PORQUE comprende una región variable de la cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID N°: 8 y 43-47.

30. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 12; y

(b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13.

31. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 93; y

(b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13.

32. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 14; y

(b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13.

33. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 94; y

(b) una cadena liviana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N°: 13.

34. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, CARACTERIZADO PORQUE comprende:

(a) una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de línea germinal de la IGHV3-21 humana; y

(b) una región variable de la cadena liviana que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de línea germinal de la IGKV3-20 humana o una secuencia de línea germinal de la IGKV3-11 humana.

35. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-13,

18-29 ó 34, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ y IgA₂ humanas.

36. El anticuerpo aislado de la reivindicación 35, CARACTERIZADO PORQUE la región constante de la cadena pesada es IgG₁.

37. El anticuerpo aislado de la reivindicación 35, CARACTERIZADO PORQUE la región constante de la cadena pesada es IgG₂.

38. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, 25-29 ó 34-37, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región constante de la cadena liviana seleccionada del grupo que consiste en las IgGκ y IgGλ humanas.

39. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, 18-29 ó 34-37, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG humana que es una variante de una región constante de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje, en donde la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana se une a receptores Fc gamma humanos seleccionados del grupo que consiste en FcγRIIB y FcγRIIA con mayor afinidad que la región constante de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje se une a los receptores Fc gamma humanos.

40. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, 18-29 ó 34-37, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG humana que es una variante de una región constante de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje, en donde la variante de la región constante de la cadena pesada de la

IgG humana se une al FcγRIIB humano con mayor afinidad que la región constante de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje se une al FcγRIIB humano.

41. El anticuerpo aislado de la reivindicación 39 ó 40, CARACTERIZADO PORQUE la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana es una variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG₁ humana, una variante de la IgG₂ humana o una variante de la IgG₄ humana.

42. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 39-41, CARACTERIZADO PORQUE la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana comprende una o más de las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración EU: G236D, P238D, S239D, S267E, L328F y L328E.

43. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 39-41, CARACTERIZADO PORQUE la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana comprende un conjunto de mutaciones de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en: S267E y L328F; P238D y L328E; P238D y una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en E233D, G237D, H268D, P271G y A330R; P238D, E233D, G237D, H268D, P271G y A330R; G236D y S267E; S239D y S267E; V262E, S267E y L328F; y V264E, S267E y L328F, de acuerdo con el sistema de numeración EU.

44. El anticuerpo aislado de la reivindicación 40, CARACTERIZADO PORQUE además comprende una o más mutaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de la IgG por el FcγRIIIA humano, el FcγRIIA humano o el FcγRI humano.

45. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 39-44, CARACTERIZADO PORQUE el FcγRIIB se expresa sobre una célula seleccionada del grupo que consiste en macrófagos, monocitos, células B, células dendríticas, células endoteliales y células T activadas.

46. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, 18-29 ó 34-37, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de la IgG humana que es una variante de una región constante de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje, en donde la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana se une a receptores Fc gamma humanos con mayor afinidad que la región constante de la cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje se une a los receptores Fc gamma humanos.

47. El anticuerpo aislado de la reivindicación 46, CARACTERIZADO PORQUE el receptor Fc gamma humano comprende un motivo de activación basado en tirosina del inmunoreceptor (ITAM).

48. El anticuerpo aislado de la reivindicación 46 ó 47, CARACTERIZADO PORQUE el receptor Fc gamma humano se selecciona del grupo que consiste en FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRI.

49. El anticuerpo aislado de la reivindicación 48, CARACTERIZADO PORQUE el receptor Fc gamma humano es FcγRIIIA.

50. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 47-49, CARACTERIZADO PORQUE la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana comprende una o más de las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración EU: G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305I, A330L, I332E, E333A,

K334A, A339T y P396L.

51. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 47-49, CARACTERIZADO PORQUE la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana comprende un conjunto de mutaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: S239D; T256A; K290A; S298A; I332E; E333A; K334A; A339T; S239D y I332E; S239D, A330L y I332E; S298A, E333A y K334A; G236A, S239D y I332E; y F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L, de acuerdo con el sistema de numeración EU.

52. El anticuerpo aislado de la reivindicación 51, CARACTERIZADO PORQUE la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana comprende las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración EU: S239D, A330L y I332E.

53. El anticuerpo aislado de la reivindicación 51, CARACTERIZADO PORQUE la variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG humana es una variante de la región constante de la cadena pesada de la IgG₁ humana que comprende las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración EU: S239D y I332E.

54. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 46-53, CARACTERIZADO PORQUE el receptor Fc gamma humano se expresa sobre una célula seleccionada del grupo que consiste en macrófagos, monocitos, células B y células dendríticas.

55. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-54, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo comprende una región Fc afucosilada.

56. Un anticuerpo aislado, CARACTERIZADO PORQUE compite de

manera cruzada por la unión a la proteína CTLA-4 humana con el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-55.

57. Un anticuerpo aislado, CARACTERIZADO PORQUE se une al mismo epítopo de la proteína CTLA-4 humana que el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-55.

58. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-57, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo se une a un epítopo que consiste en los residuos 140-141 de la SEQ ID N°: 77.

59. El anticuerpo aislado de la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo se une a por lo menos un residuo seleccionado del grupo que consiste en los residuos 140 y 141 de la SEQ ID N°: 77.

60. El anticuerpo aislado de la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo se une a un epítopo que consiste en los residuos 140-143 de la SEQ ID N°: 77.

61. El anticuerpo aislado de la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo se une a un epítopo que consiste en los residuos 135-143 de la SEQ ID N°: 77.

62. El anticuerpo aislado de la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo se une a un epítopo que consiste en los residuos 140-149 de la SEQ ID N°: 77.

63. El anticuerpo aislado de la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo se une a un epítopo que consiste en los residuos 135-149 de la SEQ ID N°: 77.

64. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-63, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo se une a un epítopo que consiste

en los residuos 80-82 de la SEQ ID N°: 77.

65. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-64, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo es un anticuerpo humano.

66. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-65, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo es antagonista de CTLA-4.

67. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-66, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo inhibe la unión de la proteína CTLA-4 humana al CD80 humano o al CD86 humano.

68. El anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-67, CARACTERIZADO PORQUE está conjugado a un agente citotóxico, un agente citostático, una toxina, un radionúclido o una marca detectable.

69. Una composición farmacéutica, CARACTERIZADA PORQUE comprende al anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-68 ó 46, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

70. Un polinucleótido aislado, CARACTERIZADO PORQUE codifica una cadena pesada y/o liviana del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-68.

71. Un vector, CARACTERIZADO PORQUE comprende al polinucleótido de la reivindicación 70.

72. Una célula huésped recombinante, CARACTERIZADA PORQUE comprende al polinucleótido de la reivindicación 70 o al vector de la reivindicación 71.

73. Un método para producir un anticuerpo que se une al CTLA-4 humano, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 72 de modo tal que se expresa el

polinucleótido y el se produce el anticuerpo.

74. Un método para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-69.

75. Un método de tratamiento de cáncer en un sujeto, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-69.

76. El método de la reivindicación 74 ó 75, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo o la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea o intravenosa.

77. El método de la reivindicación 76, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo o la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa a razón de 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg o 10 mg/kg, opcionalmente a un intervalo de una vez cada tres semanas.

78. El método de la reivindicación 76, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo o la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea, en donde el anticuerpo es el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 46-53.

79. El método de la reivindicación 74 ó 75, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo o la composición farmacéutica se administra por vía intratumoral.

80. El método de la reivindicación 79, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo o la composición farmacéutica se administra por vía intratumoral a

razón 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg o 0,3 mg/kg, opcionalmente a un intervalo de una vez cada tres semanas.

81. El método de la reivindicación 79 ú 80, CARACTERIZADO PORQUE además comprende administrar un agente terapéutico adicional al sujeto, opcionalmente en donde el agente terapéutico adicional se administra por vía sistémica.

82. El método de la reivindicación 81, CARACTERIZADO PORQUE el sujeto tiene un tumor sólido y en donde el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-PD-1, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab o nivolumab.

83. El método de la reivindicación 81, CARACTERIZADO PORQUE el sujeto tiene carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y en donde el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-EGFR, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-EGFR es cetuximab,

opcionalmente en donde el método comprende además administrar un agente quimioterapéutico al sujeto, opcionalmente en donde el agente quimioterapéutico se administra por vía sistémica, opcionalmente en donde el agente quimioterapéutico es gemcitabine.

84. El método de la reivindicación 81, CARACTERIZADO PORQUE el sujeto tiene cáncer de mama HER2+ y en donde el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-HER2, opcionalmente en donde el anticuerpo anti-HER2 es trastuzumab,

opcionalmente en donde el método comprende además administrar un agente quimioterapéutico al sujeto, opcionalmente en donde el agente quimioterapéutico se administra por vía sistémica, opcionalmente en donde el

agente quimioterapéutico es gemcitabine.

85. El método de cualquiera de las reivindicaciones 79-84, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo es el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 46-53.

86. El método de la reivindicación 74 ó 75, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo o la composición farmacéutica se suministra en un nódulo linfático de drenaje tumoral.

87. El método de la reivindicación 86, CARACTERIZADO PORQUE el anticuerpo es el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 46-53.

88. El método de cualquiera de las reivindicaciones 74-87, CARACTERIZADO PORQUE además comprende administrar un agente terapéutico adicional al sujeto.

89. El método de la reivindicación 88, CARACTERIZADO PORQUE el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente de direccionamiento a un punto de control.

90. El método de la reivindicación 89, CARACTERIZADO PORQUE el agente de direccionamiento a un punto de comprobación se selecciona del grupo que consiste en un antagonista de un anticuerpo anti-PD-1, un antagonista de un anticuerpo anti-PD-L1, un antagonista de un anticuerpo anti-PD-L2, un antagonista de un anticuerpo anti-CTLA-4, un antagonista de un anticuerpo anti-TIM-3, un antagonista de un anticuerpo anti-LAG-3, un antagonista de un anticuerpo anti-CEACAM1, un agonista de un anticuerpo anti-GITR y un agonista de un anticuerpo anti-OX40.

91. El método de la reivindicación 88, CARACTERIZADO PORQUE el agente terapéutico adicional es un inhibidor de la indolamina-2,3-dioxigenasa

(IDO).

92. El método de la reivindicación 91, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor se selecciona del grupo que consiste en epacadostat, F001287, indoximod y NLG919.

93. El método de la reivindicación 92, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor es epacadostat.

94. El método de la reivindicación 92, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor es F001287.

95. El método de la reivindicación 92, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor es indoximod.

96. El método de la reivindicación 92, CARACTERIZADO PORQUE el inhibidor es NLG919.

97. El método de la reivindicación 88, CARACTERIZADO PORQUE el agente terapéutico adicional es una vacuna.

98. El método de la reivindicación 97, CARACTERIZADO PORQUE la vacuna comprende un complejo de péptidos de la proteína del shock de calor (HSPPC) que comprende una proteína del shock de calor complejada con un péptido antigénico.

99. El método de la reivindicación 98, CARACTERIZADO PORQUE la proteína del shock de calor es una proteína gp96 y está complejada con un péptido antigénico asociado a tumores, en donde el HSPPC deriva de un tumor obtenido de un sujeto.

100. Uso del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-67, CARACTERIZADO PORQUE es en la preparación de una composición farmacéutica o un medicamento para una inmunoterapia.

101. Uso del anticuerpo aislado de cualquiera de las reivindicaciones 1-67, CARACTERIZADO PORQUE está conjugado a un agente citotóxico, un agente citostático, una toxina, un radionúclido o una marca detectable en la preparación de un medicamento para una inmunoterapia.

102. Uso de la composición farmacéutica de la reivindicación 69, CARACTERIZADO PORQUE es en la preparación de un medicamento para una inmunoterapia.

103. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 100-102, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoterapia es para aumentar la activación de células T como respuesta a un antígeno en un sujeto.

104. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 100-102, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoterapia es para el tratamiento de cáncer.

105. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 100-102, CARACTERIZADO PORQUE la inmunoterapia es para el tratamiento o la prevención de enfermedades infecciosas.

p.p. 1) Agenus Inc.

2) Ludwig Institute for Cancer Research Ltd.

3) Memorial Sloan- Kettering Cancer Center

Miguel N. Armando (2246)

REIVINDICACIÓN COMPLEMENTARIA

Un anticuerpo aislado, CARACTERIZADO PORQUE se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena liviana que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

(a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos SYX₁MX₂ (SEQ ID N°: 22), en donde

X₁ es S o A; y

X₂ es N o S;

(b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos SSSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID N°: 2);

(c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos VGLMGPFXI (SEQ ID N°: 23), en donde

X es D o N;

(d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID N°: 24), en donde:

X₁ es S o G;

X₂ es R, S o T; y

X₃ es G o A;

(e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID N°: 25), en donde:

X₁ es G o A;

X_2 es A o T; y

X_3 es T, S, R o N; y

(f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos QQYGX₁SPX₂T
(SEQ ID N°: 26), en donde:

X_1 es S o T; y

X_2 es W o F.

ANTICUERPOS ANTI-CTLA-4 Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS

RESUMEN

Anticuerpos que se unen específicamente al CTLA-4 humano y antagonizan la función del CTLA-4. También se proveen composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos, ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos, vectores de expresión y células huésped para elaborar estos anticuerpos, y métodos de tratamiento de un sujeto usando estos anticuerpos.

Figura 1A

RESONANCIA DE PLASMÓN SUPERFICIAL (K_D)

	HUMANO		CINOMOLGO		RATÓN	RATA	
	CTLA-4		CTLA-4		CTLA-4	CTLA-4	
	DÍMERO	MONÓMERO	DÍMERO	MONÓMERO	DÍMERO	DÍMERO	MONÓMERO
AGEN1884	0.6 nM	0.8 nM	6.2 nM	1.6 nM	9.9 nM	No hay unión	No hay unión
Anticuerpo de referencia (IgG1)	0.54 nM	1.2 nM	1.2 nM	0.75 nM	1.2 nM	26 nM	22 nM

Figura 1B

CTLA-4Células que expresan

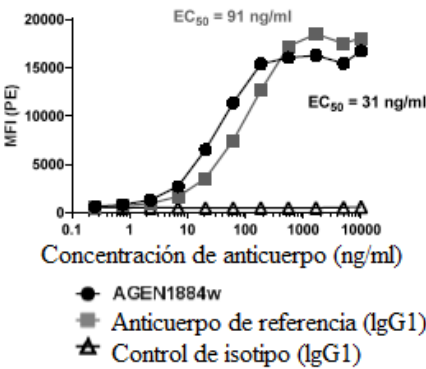


Figura 1C

ENSAYO DE SELECTIVIDAD DEL CTLA-4

	Conc. en ng/ml	rhCTLA-4 Fc (R&D)	rcCTLA-4 Fc (Sino)	rhCD28 Fc (R&D)	rhICOS Fc (R&D)	rhBTLA Fc (Sino)	rhPD-1 Fc (R&D)	rcPD-1 Fc (4AB)
AGEN1884	1000	22729	16557	45	43	87	15	32
	100	20859	12676	48	47	115	25	41
	10	7820	4096	77	60	95	32	46
Anticuerpo de referencia (IgG1)	1000	20845	21580	52	46	97	24	40
	100	19131	19810	55	53	87	28	41
	10	6825	7245	65	57	92	35	41
Control de isotipo (IgG1)	1000	79	154	57	34	73	31	49
	100	75	166	67	67	123	39	45
	10	88	175	52	48	91	31	30

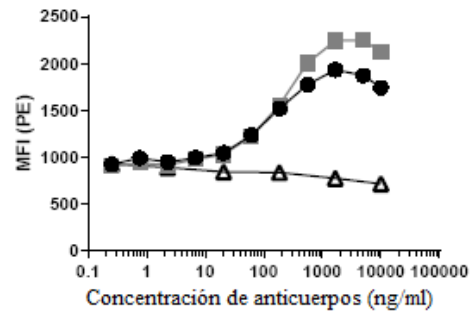
Figura 1D

Afinidad de unión relativa

	AGEN1884	Anticuerpo de referencia (IgG1)	Control de isotipo (IgG1)
rhCTLA-4	+++	+++	—
rcCTLA-4	+++	+++	—
rhCD28	—	—	—
rhICOS	—	—	—
rhBTLA	—	—	—
rhPD-1	—	—	—
rcPD-1	—	—	—

Figura 2A

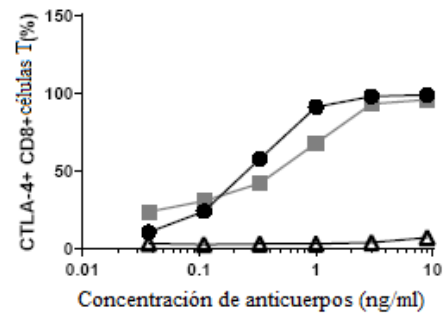
CÉLULAS T PRIMARIAS HUMANAS
(SUPERFICIE)



● AGEN1884w
■ Anticuerpo de referencia (IgG1)
▲ Control de isotipo (IgG1)

Figura 2B

CÉLULAS T PRIMARIAS HUMANAS
(INTRACELULAR)



● AGEN1884
■ Anticuerpo de referencia (IgG1)
▲ Control de isotipo (IgG1)

Figura 2C

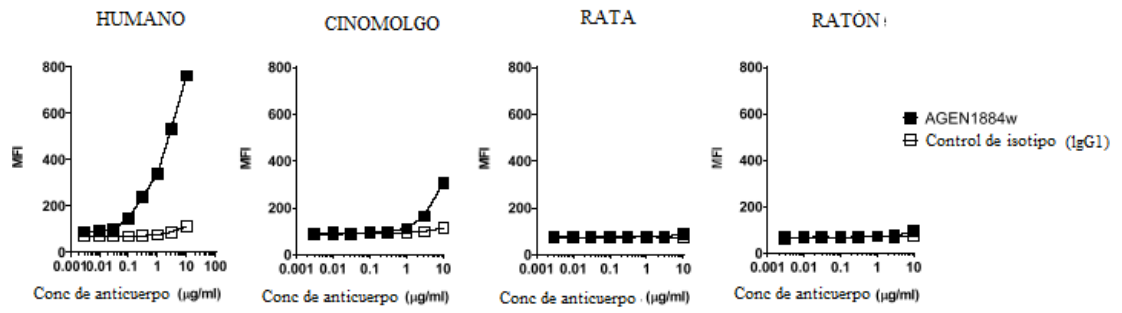


Figura 3A

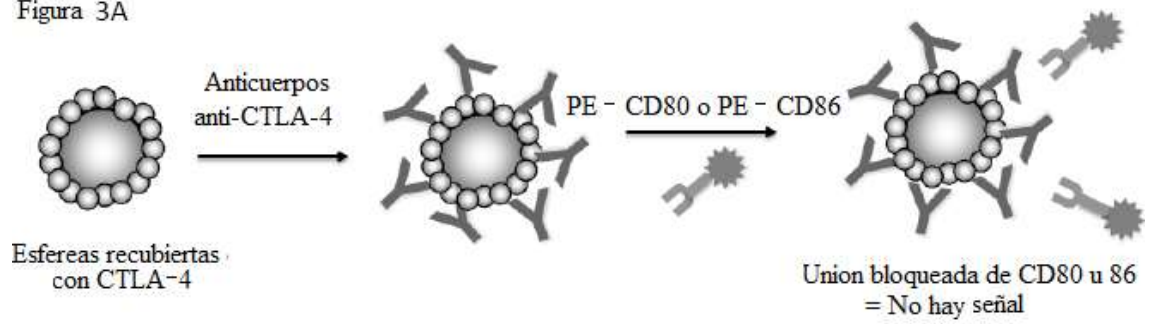


Figura 3B

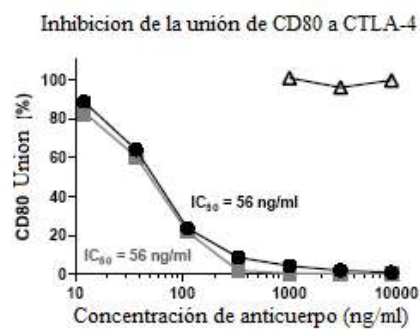
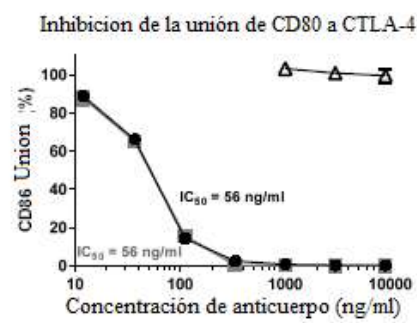


Figura 3C



- AGEN1884
- Anticuerpo de referencia (IgG1)
- △ Control de isotipo (IgG1)

Figura 3D

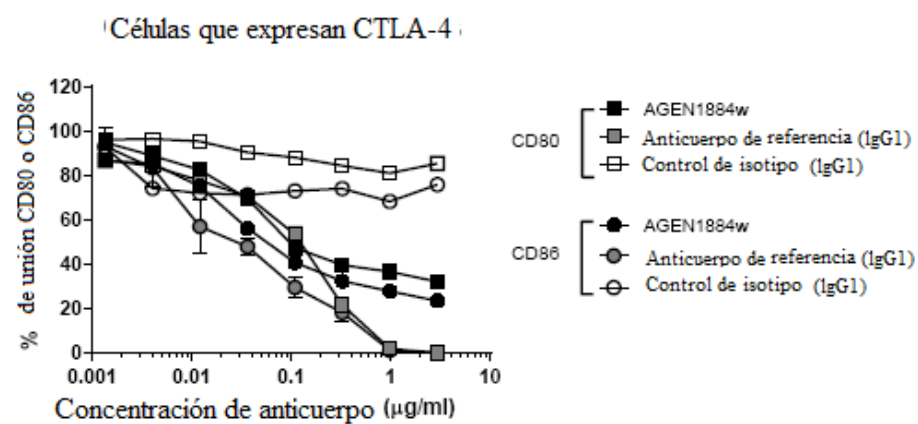


Figura 3E

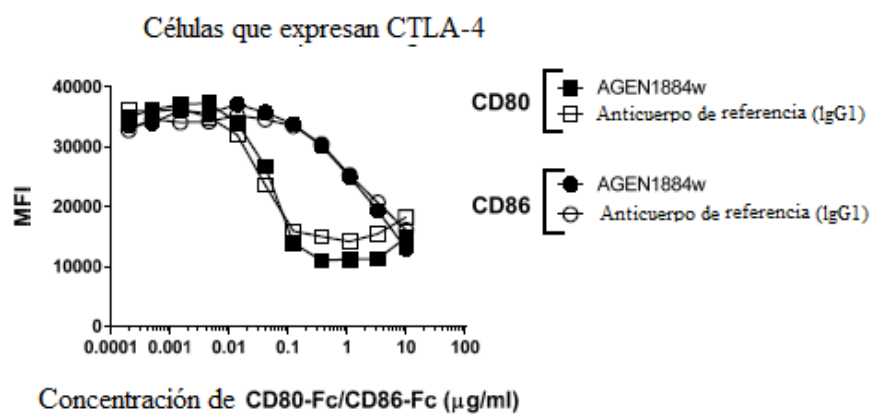


Figura 4A

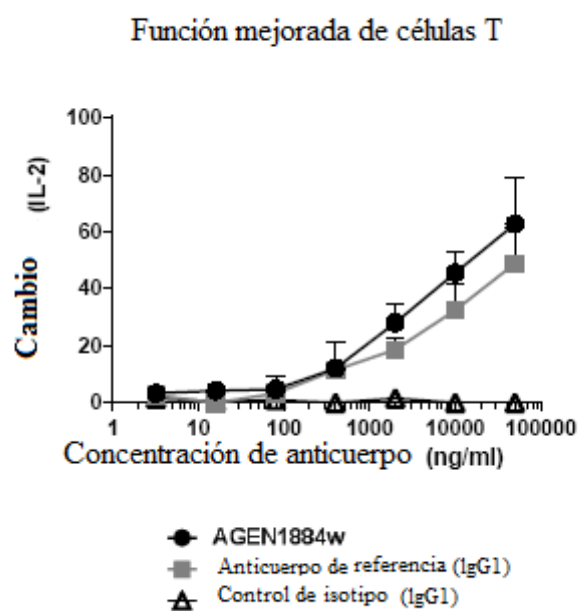


Figura 4B

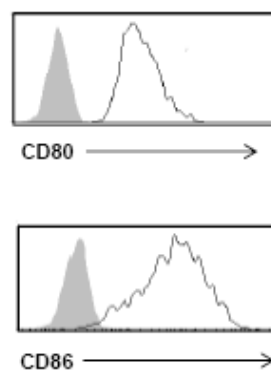


Figura 4C

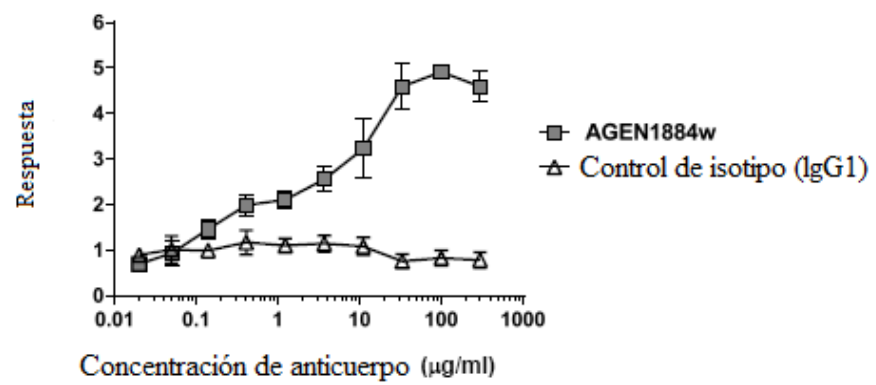


Figura 4D

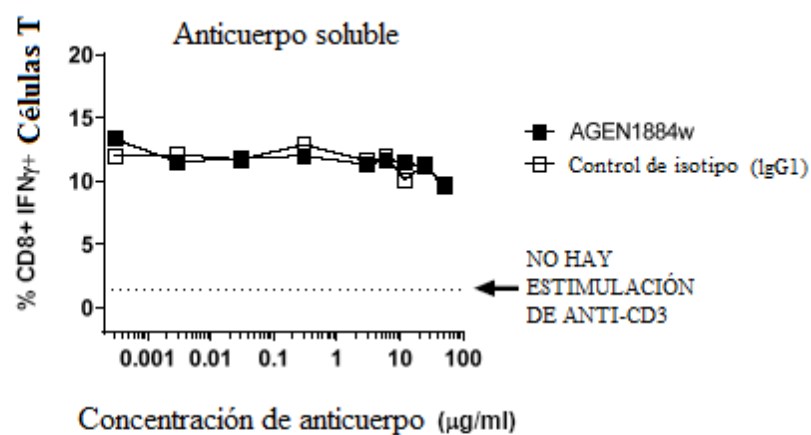


Figura 4E

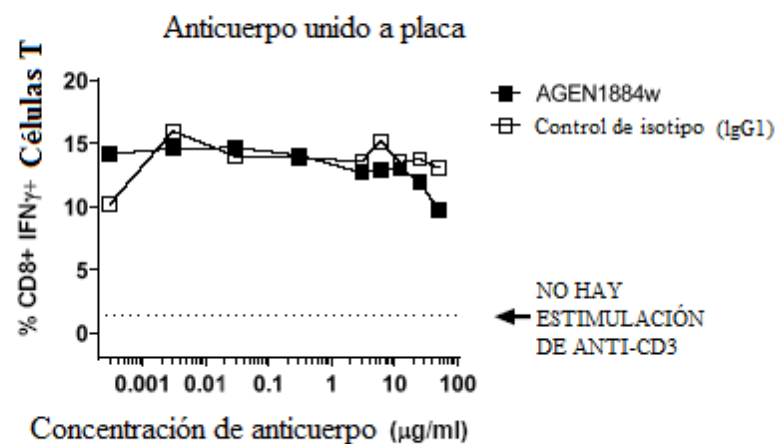


Figura 4 F

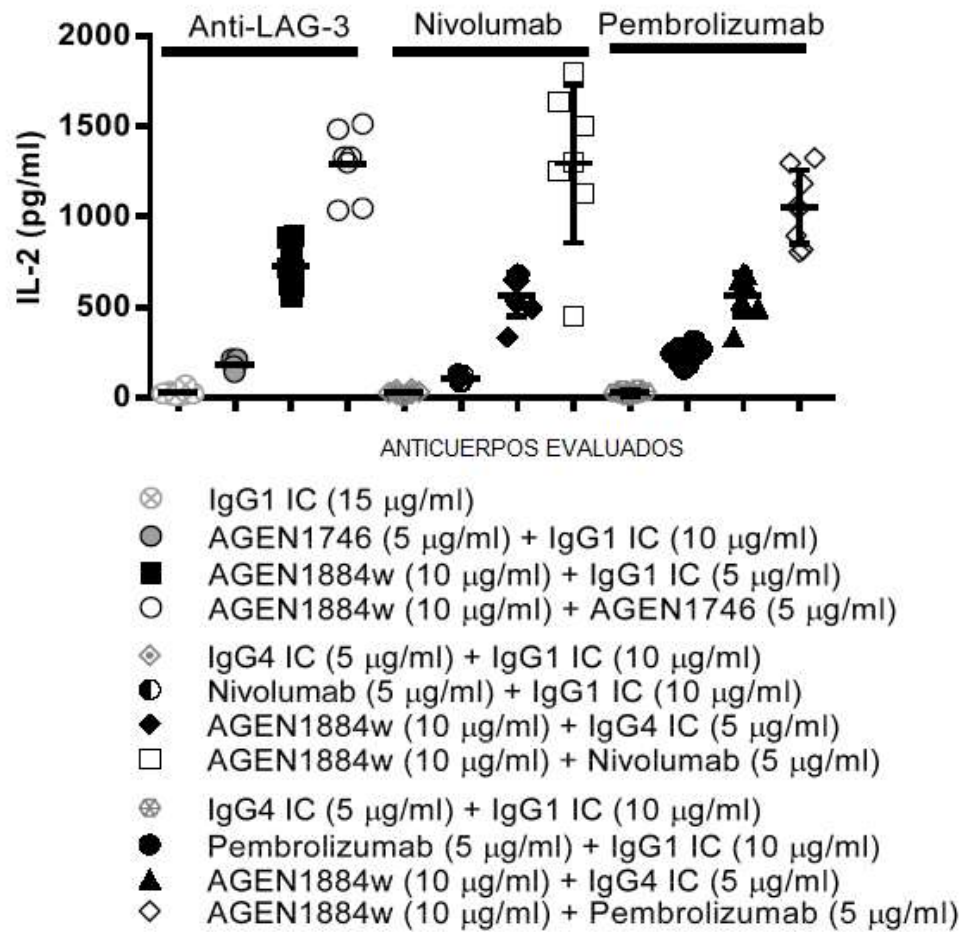


Figura 5A

Resonancia de plasmón superficial (K_D)

	Humano		Cinomolgo	
	CTLA-4		CTLA-4	
	dímero	monómero	dímero	monómero
AGEN2041w	1.7 nM	2.0 nM	4.4 nM	2.1 nM
Anticuerpo de referencia (IgG1)	0.5 nM	1.2 nM	1.2 nM	0.8 nM
Anticuerpo de referencia (IgG2)	1.5 nM	1.6 nM	3.1 nM	1.5 nM

Figura 5B

Células que expresan CTLA-4

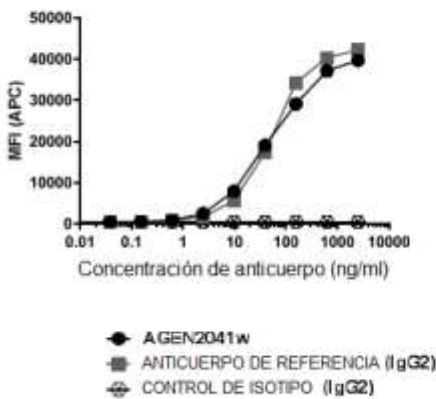


Figura 5C

Inhibición de la unión de CD80 y CD86 a CTLA-4

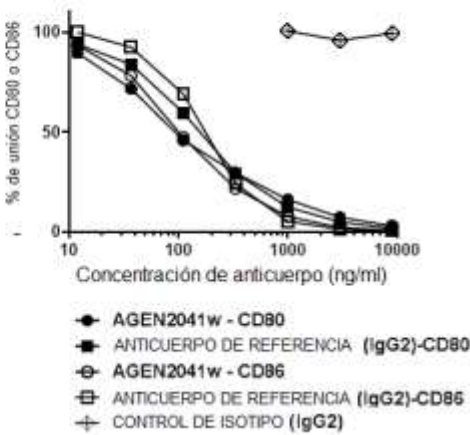


Figura 5D

ENSAYO DE SELECTIVIDAD DE CTLA-4

	CONC. EN NG/ML	rhCTLA-4 Fc (R&D)	rcCTLA-4 Fc (Sino)	rhCD28 Fc (R&D)	rhICOS Fc (R&D)	rhBTLA Fc (Sino)	rhPD-1 Fc (R&D)	rcPD-1 Fc (4AB)
AGEN2041w	1000	16693	13885	58	48	95	30	31
	100	15890	9949	42	43	104	19	27
	10	7737	3684	73	55	89	32	29
ANTICUERPO DE REFERENCIA (IGG2)	1000	17288	16442	58	49	106	33	39
	100	13932	13721	62	47	102	43	50
	10	4846	5143	71	59	111	36	60
CONTROL DE ISOTIPO (IGG2)	1000	79	158	64	41	93	36	41
	100	83	184	52	57	88	94	96
	10	80	187	55	58	99	79	70

Figura 5E

AFINIDAD DE UNIÓN RELATIVA

	AGEN2041w	ANTICUERPO DE REFERENCIA (IGG2)	CONTROL DE ISOTIPO (IGG2)
rhCTLA-4	+++	+++	—
rcCTLA-4	+++	+++	—
rhCD28	—	—	—
rhICOS	—	—	—
rhBTLA	—	—	—
rhPD-1	—	—	—
rcPD-1	—	—	—

Figura 6A

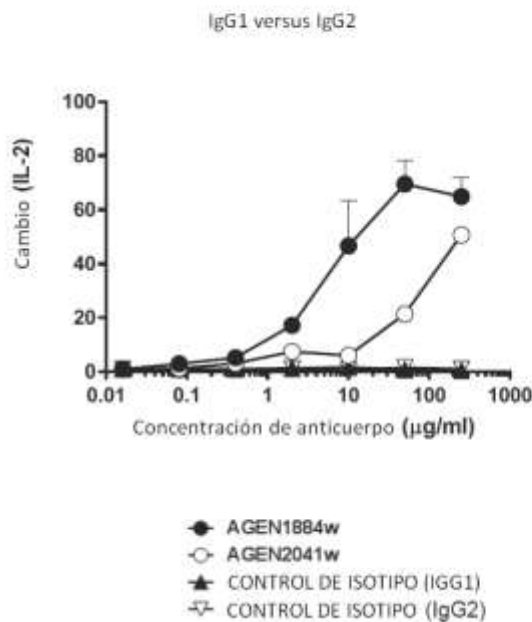


Figura 6B

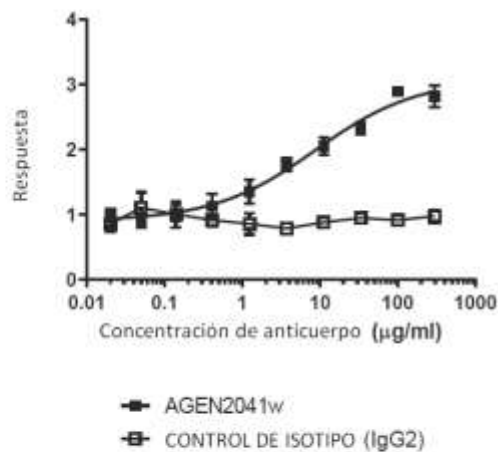


Figura 7A

Células que expresan CTLA-4

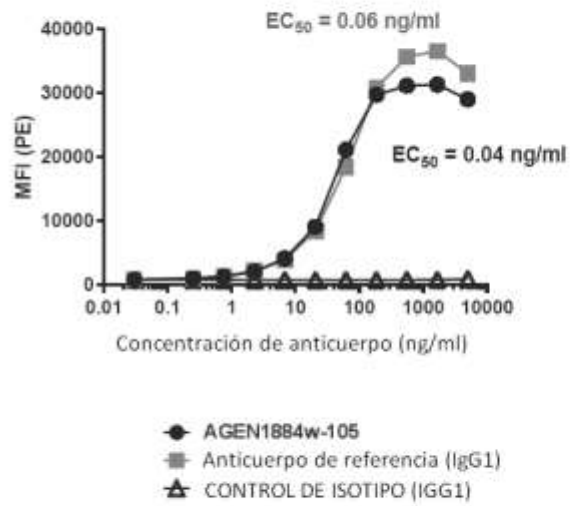


Figura 7B

Función mejorada de las células T

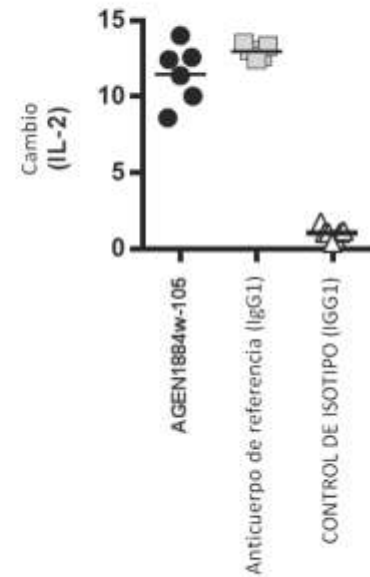


Figura 8A

Unión a células rCHO-huFcγRIIA+

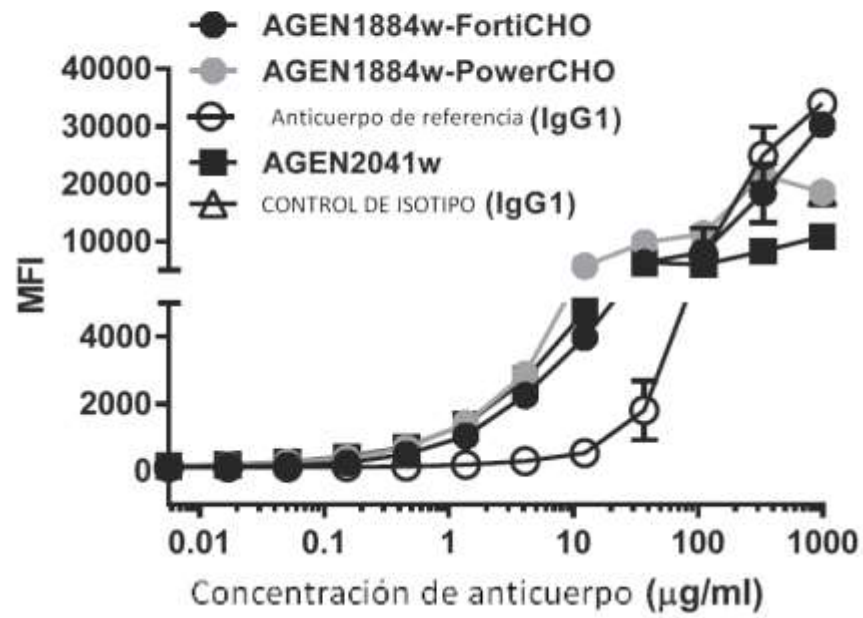


Figura 8B

Unión a células rCHO-huFcγRIIB+

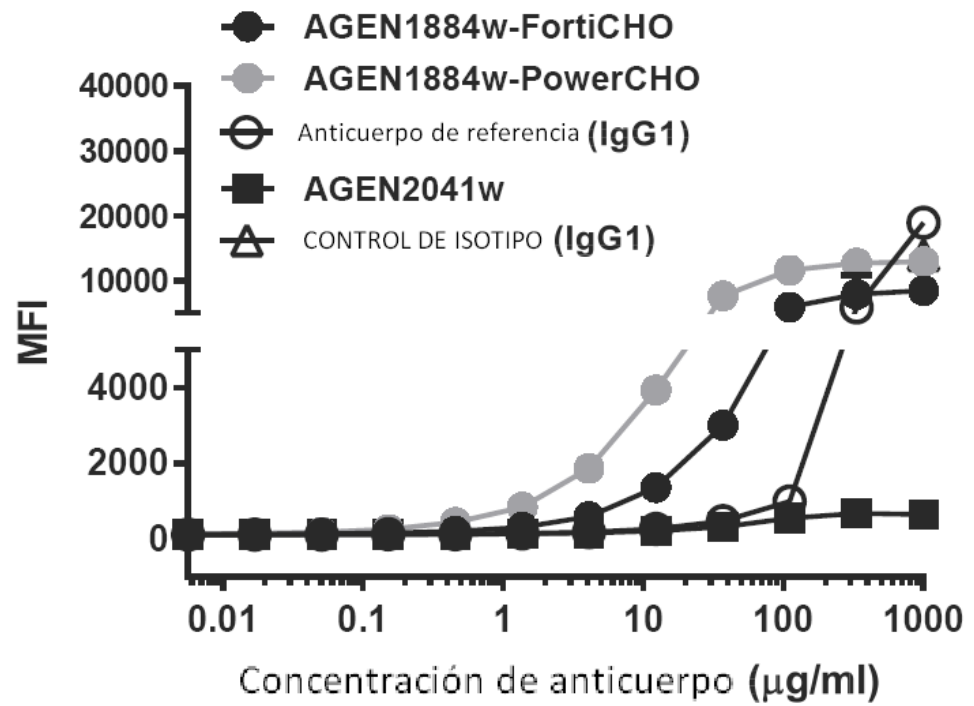


Figura 8C

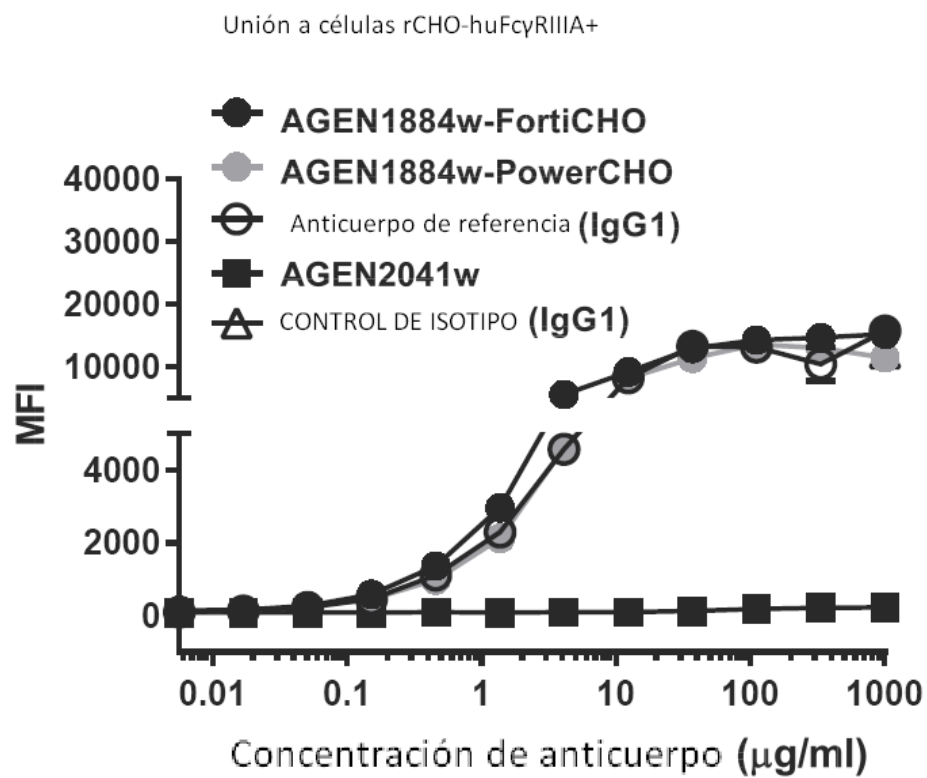


Figura 9A

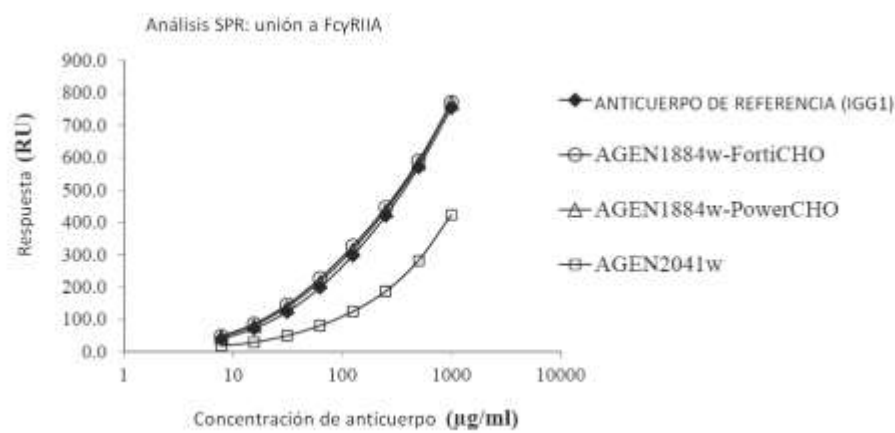


Figura 9B

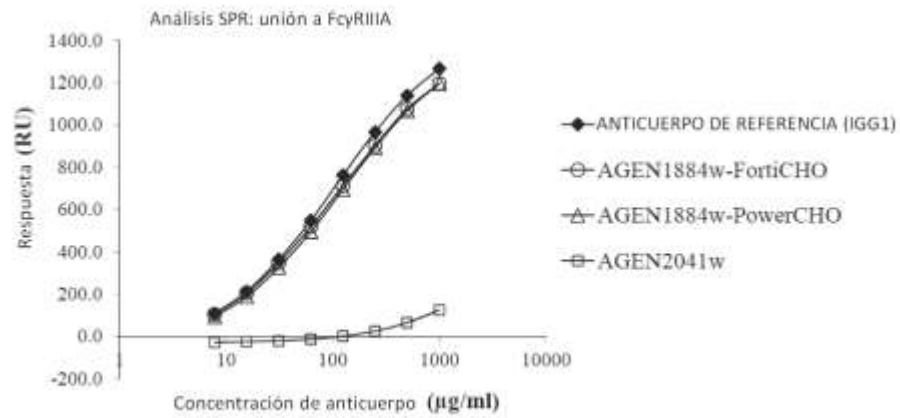


Figura 10A

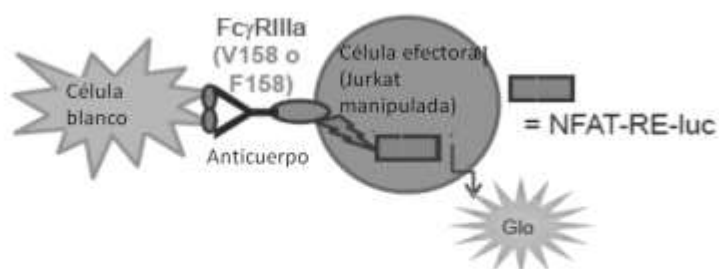


Figura 10B

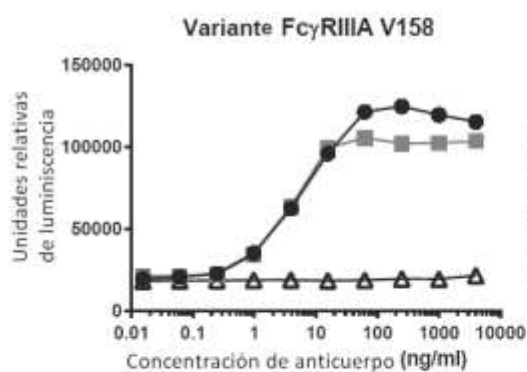
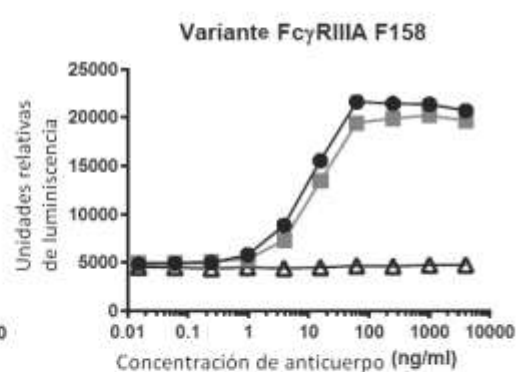


Figura 10C



- AGEN1884w-105
- ANTICUERPO DE REFERENCIA (IGG1)
- △ CONTROL DE ISOTIPO (IGG1)

Figura 10D

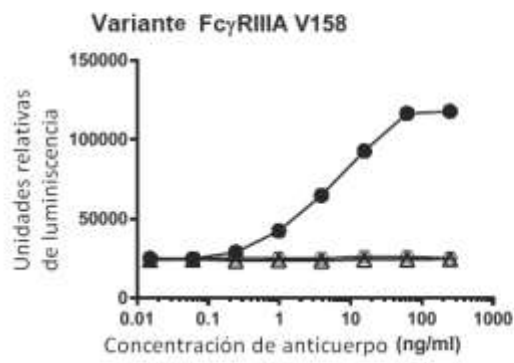
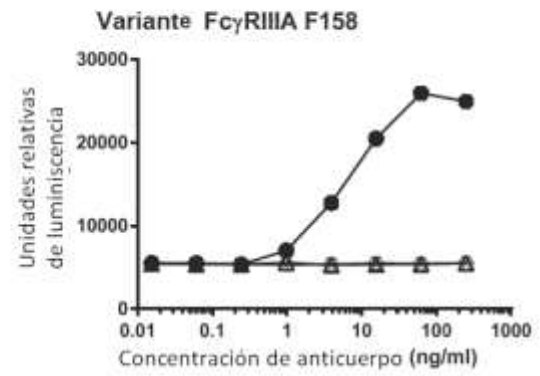


Figura 10E



- AGEN1884w
- ANTICUERPO DE REFERENCIA (IGG1)
- ▲ CONTROL DE ISOTIPO (IGG1)

Figura 10F

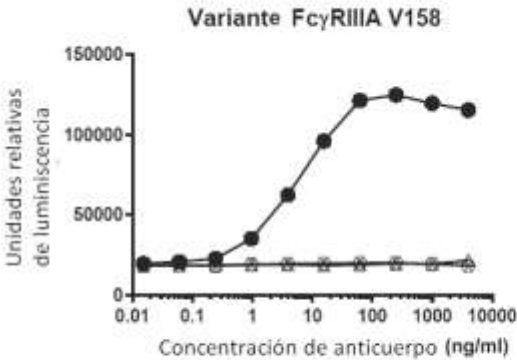
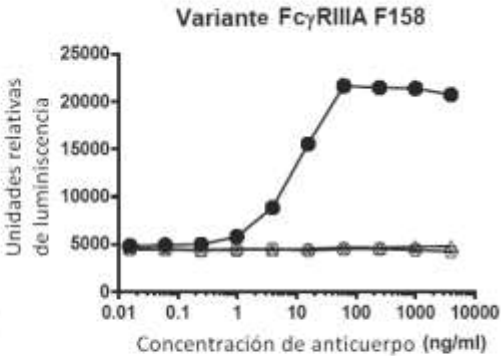


Figura 10G



- AGEN1884w-105
- AGEN1884w-N297A
- △ CONTROL DE ISOTIPO (IGG1)

Figura 11

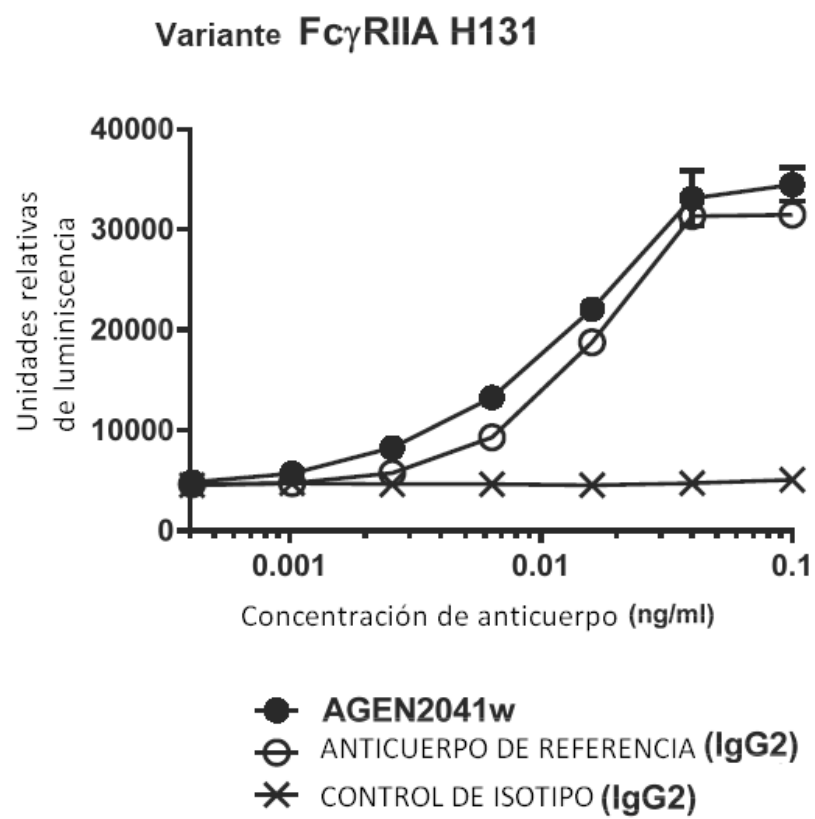


Figura 12A

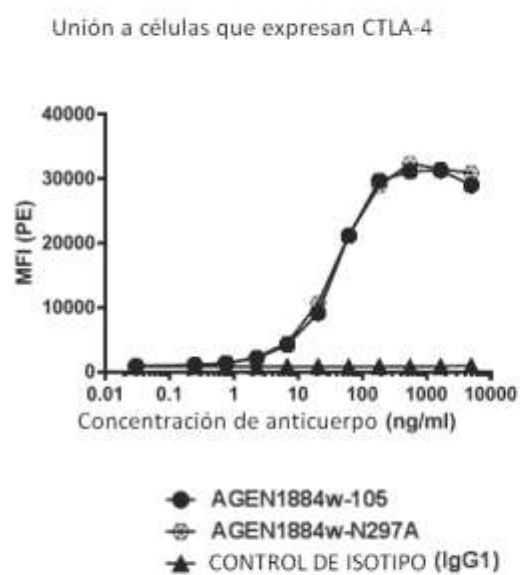
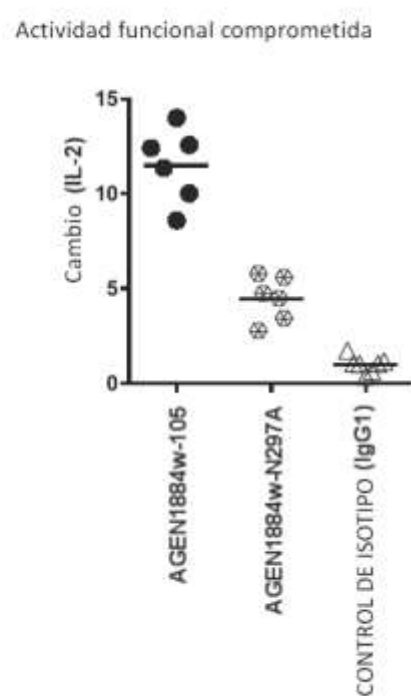


Figura 12B



Actividad funcional comprometida

Cambio (IL-2)

ANTICUERPO DE REFERENCIA (IgG1)

ANTICUERPO DE REFERENCIA (IgG1) + Bloqueo de FcR

CONTROL DE ISOTIPO (IgG1)

Actividad funcional comprometida

IL-2 (pg/ml)

3000

2000

1000

0

AGEN1884w-105 + Isotipo de ratón

AGEN1884w-105 + Bloqueo de FcR *

CONTROL DE ISOTIPO (IgG1) + Isotipo de ratón

Figura 14

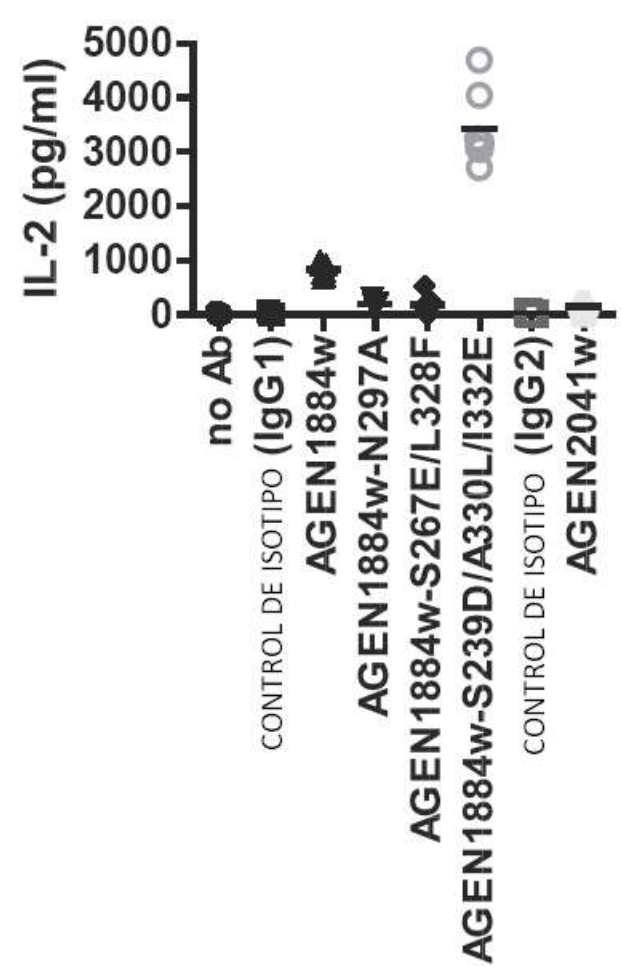


Figura 15

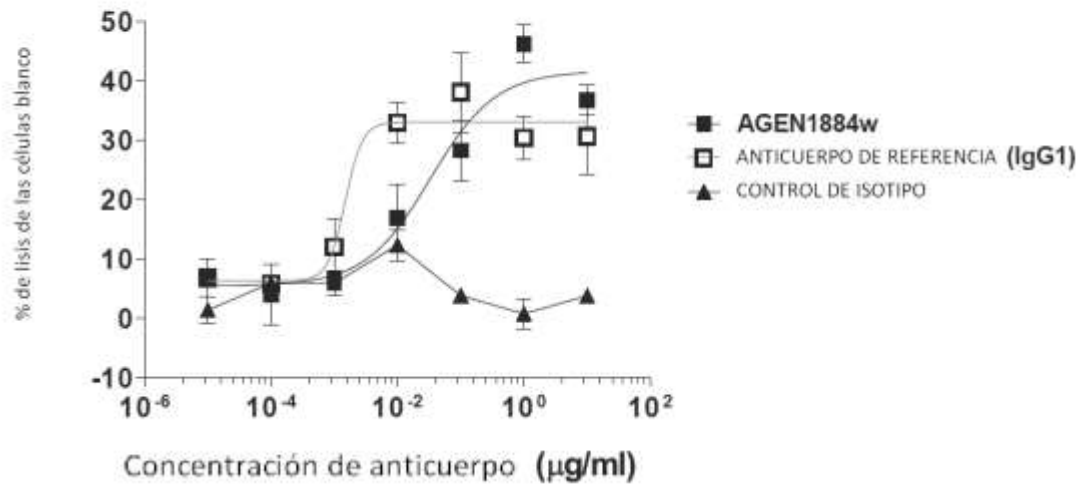
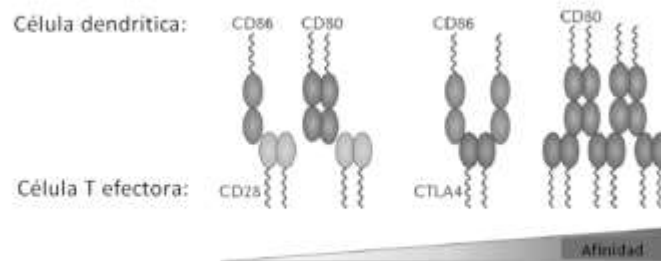


Figura 16



Walker y Sansom, Nat. Rev. Immunology, 2011

CTLA-4-Ig	K_D (nM)
CD80-Fc-His*	0.3 nM
CD86-Fc-His*	3.6 nM
ANTICUERPO DE REFERENCIA (IgG1)	0.5 nM
AGEN1884	0.6 nM

*Modified from: Xu et al., JI 2012

Figura 17A

P16410	CTLA4_HUMAN	1	MACLGFGQRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLAASSRGIASFVCEY	60
G7PL88	CTLA4_MACFA	1	R.....R.Y....S.....S.....N.....	60
P09793	CTLA4_MOUSE	1	LR.Y....Q.PS....EVA.LT.....SE.IQ.T..S.....H.V...P...	60
Q62859	CTLA4_RAT	1	L..Y.TH.Q.PS....EGV.LS.....I.SE.IQ.T..S.....H.V...P...	60
			*****:*:*:*:*:* * * * : *****:*:*:*:*:*:*:*:*:* *	
P16410	CTLA4_HUMAN	61	ASPGKATEVRVTVLQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLR	120
G7PL88	CTLA4_MACFA	61		120
P09793	CTLA4_MOUSE	61	SPSHNTD.....TND.M.....T.FTEK.TVG...YFF.S..FNESR.....	120
Q62859	CTLA4_RAT	61	..SHNTD.....TND.....T.FTVK.T.G....PF.S..FNESR.....	120
			: : : *****11.*:*****:* * : *** :*:* . .1*****	
P16410	CTLA4_HUMAN	121	AMDTGLYICKVELMYPPFYLLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWLAAVSSGLFFYSFL	180
G7PL88	CTLA4_MACFA	121	M.....	180
P09793	CTLA4_MOUSE	121	.V.....L.....FV.M.....V...L.....	180
Q62859	CTLA4_RAT	121	.A.....F.....FV.M.....	180
			* *****:*****:*:*:*****:*** *****	
P16410	CTLA4_HUMAN	181	LTAVSLSEMLKKRSPLTTGVYVKNMPPEPECEKQFQPYFIPIN	223
G7PL88	CTLA4_MACFA	181		223
P09793	CTLA4_MOUSE	181	VS.....	223
Q62859	CTLA4_RAT	181	V....NRT.....	223
			:*****: *****	

Figura 17B

```

SP|P16410|CTLA4_HUMAN  MACLGFRHKAQINLATRTWPCTLLFFLLFIP--VFC-----KAMHVAQPAVVLA--- 48
TR|G7PL88|G7PL88_MACFA MACLGFRHKAQINLATRTWPCTLLFFLLFIP--VFS-----KAMHVAQPAVVLA--- 48
SP|P10747|CD28_HUMAN  -----MLRLLALN--LFPS-IQVTGNKILVKQSP-MLV--- 30
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMAN  -----MKSGLWY-----FF--LFCLRIKVLTEINGSANYEMFI--- 32
SP|Q726A9|BTLA_HUMAN  -----MKTLPAMLGTGKLFVW---FFLIPLYLDIWNHKGESCDVQLYIK 41
SP|Q15116|PDCD1_HUMAN -----MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPD-RPWNPPPTFSPALLVV--- 44
                                *
                                :

SP|P16410|CTLA4_HUMAN  -----SSRGIASFVCEYASPGKA---TEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNE--LT 96
TR|G7PL88|G7PL88_MACFA -----NSRGIASFVCEYASPGKA---TEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNE--LT 96
SP|P10747|CD28_HUMAN  -----AYDNAVNLSCKYSYNLFS---REFRASLHKGLDSA-VEVCVVYGNYSQQQLQVY 79
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMAN  -----FHNQGVQILCKYPD--IV---QQFRMQLLKGGQ---ILCDLTKTGSGNTVS 76
SP|Q726A9|BTLA_HUMAN  RQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCKLN---GT-----TCVKLEDRO--- 86
SP|Q15116|PDCD1_HUMAN -----TEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWRMSPSNQTDK---LAAFPEDR----- 86
                                : *
                                :
                                .

SP|P16410|CTLA4_HUMAN  FLDDSICT---GTSSGNQVNLTI---QGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGIG----- 144
TR|G7PL88|G7PL88_MACFA FLDDSICT---GTSSGNQVNLTI---QGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGIG----- 144
SP|P10747|CD28_HUMAN  SKTGFNCD---GKLGNESVTFFL---QNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEK----- 127
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMAN  IKSLKFCH---SGLSNNSVVSFFL---YNLDHSHANYFYCNLSIFDPPPPFKVTLT----- 124
SP|Q726A9|BTLA_HUMAN  -----TSWKEEKNIFFILHFEPLPNDNGSYRCSANFQSNL---IE----- 125
SP|Q15116|PDCD1_HUMAN SQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSV---VRARNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELR 143
                                ... : :
                                . * *

```

Figura 17C

```

SP|P16410|CTLA4_HUMAN -NGTQIYVIDP-----EPCPDS-----DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL--S-KML 190
TR|G7PL88|G7PL88_MACFA -NGTQIYVIDP-----EPCPDS-----DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL--S-KML 190
SP|P10747|CD28_HUMAN SNGTIIHVKGK-----HLCPSPLFPGPSKPFVVLVVVGGVLACYSLLVTVAFI--IFWVR 180
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMAN --GGYLHIYES-----QLCCQL-----KFWLPIGCAA--FVVVCILGCIL--ICWLT 165
SP|Q726A9|BTLA_HUMAN SHSTTLVYTDVKSASERPSKDEMASR-PWLLYRLLPLGG----LPLLITTCFCLFCLRR 180
SP|Q15116|PDCD1_HUMAN VTERRAEVPTA-----HPSFSPRPAG-QFQTLVVGVVGGLLGSLVLLVWVLAV--ICSPA 195
      :          . . .          . .          . :

SP|P16410|CTLA4_HUMAN KKRSP----LTTGVYVKMPPE-----PEC-EKQFQPYFIPIN----- 223
TR|G7PL88|G7PL88_MACFA KKRSP----LTTGVYVKMPPE-----PEC-EKQFQPYFIPIN----- 223
SP|P10747|CD28_HUMAN SKRSR----LLHSDYMNMTFRR-----PGPTRKHYQPYAFPRD--FAAYRS----- 220
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMAN KKKYSSSVHDPNGEYMFMRVAVN---TAKKSRLTDVTL----- 199
SP|Q726A9|BTLA_HUMAN HQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRQEGS 240
SP|Q15116|PDCD1_HUMAN ARG-----TIG-----ARR-----TGQP-LKEDPSAVPVF--SVDYGELDFQWREKT 234
      :          .          .          .

SP|P16410|CTLA4_HUMAN -----
TR|G7PL88|G7PL88_MACFA -----
SP|P10747|CD28_HUMAN -----
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMAN -----
SP|Q726A9|BTLA_HUMAN EVYSNPCLEENKP--GIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASI-----CVRS- 289
SP|Q15116|PDCD1_HUMAN PEPPVPCVPEQTEYATIVFP---SGMGTSSPARRGSDGPRSAQPLRPEDGHCSWPL 288

```

Figura 17D

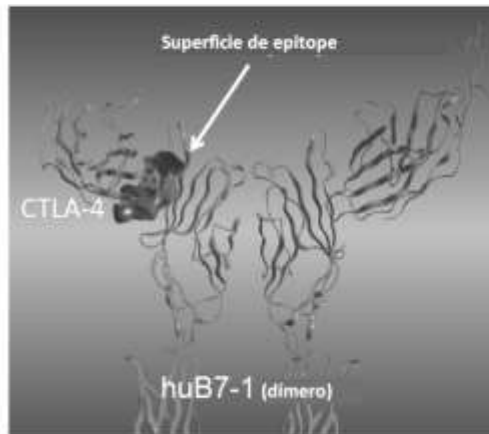


Figura 17E

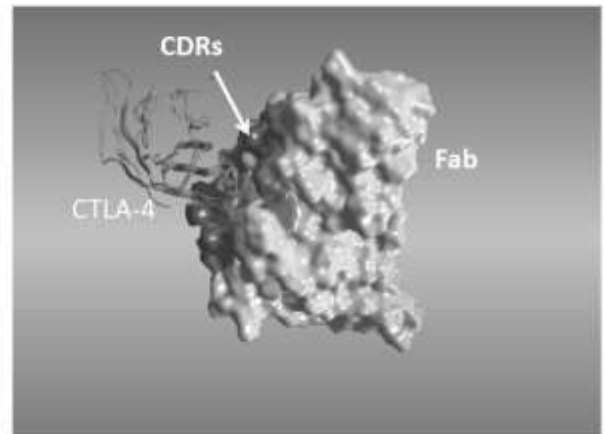


Figura 18A

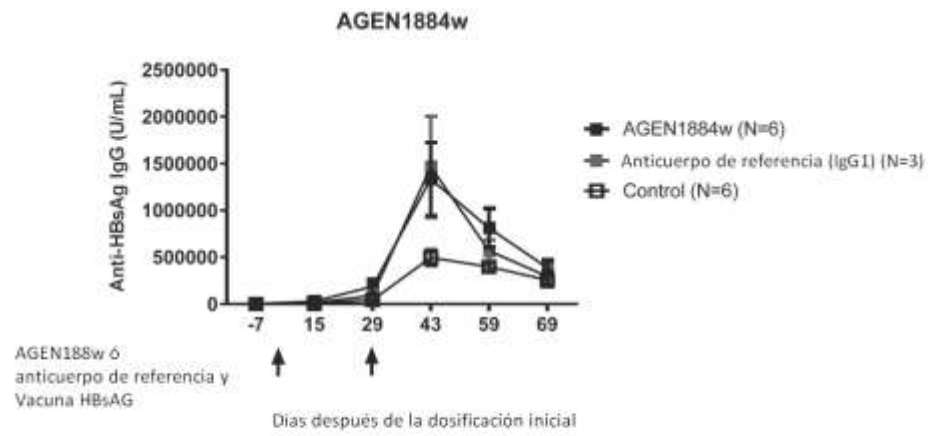


Figura 18B

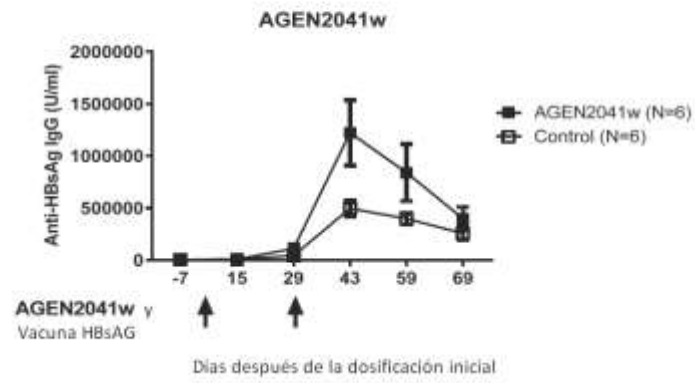


Figura 19A

		CDRH1										CDRH2										
		10		20		30		40		50		60										
BADD411-2354	EVQIVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYY																					60
BADD412-2356	...L...Q...A.S...V...																					60
BADD412-2357																						60
BADD412-2358	...L...																					60
BADD412-2359	...L...Q...A.S...V...																					60
BADD412-2360	...Q...T...																					60

		CDRH3												
		70		80		90		100		110				
BADD411-2354	ADSVKGRFTISRDAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS													118
BADD412-2356														118
BADD412-2357	T.....													118
BADD412-2358														118
BADD412-2359	N.....													118
BADD412-2360														118

Figura 19B

		CDRL1					CDRL2			
		10	20	30	40	50	60			
BADD412-2376	EIVLTQSPGTL	SLSPGERATL	SCRASQSVSR	YLGWYQ	QKPGQAPR	LLIYGASTRA	TGIPD			60
BADD412-2367	A.....	GT..A..	H.V.....	R.....						60
BADD412-2382	A.....	S..A..	S.....	AT.S.....						60
BADD412-2384	A...F.....	S..A..	S.....							60
BADD412-2390	A...V.....	S..A..	A.....							60
BADD412-2393	A.....	S..A..	N.....	A.....						60

		CDRL3					
		70	80	90	100		
BADD412-2376	RFSGSGSGTD	FTLTITRLEP	EDFAVYYC	QQYGSSPW	TFGQGTKVEIK		107
BADD412-2367	S.....						107
BADD412-2382	V.....	S.....	T.....				107
BADD412-2384	F..S.....	F.....	P...D..				107
BADD412-2390	A.....	S.....					107
BADD412-2393	SS.....	F.....	P...D..				107

Figura 20A

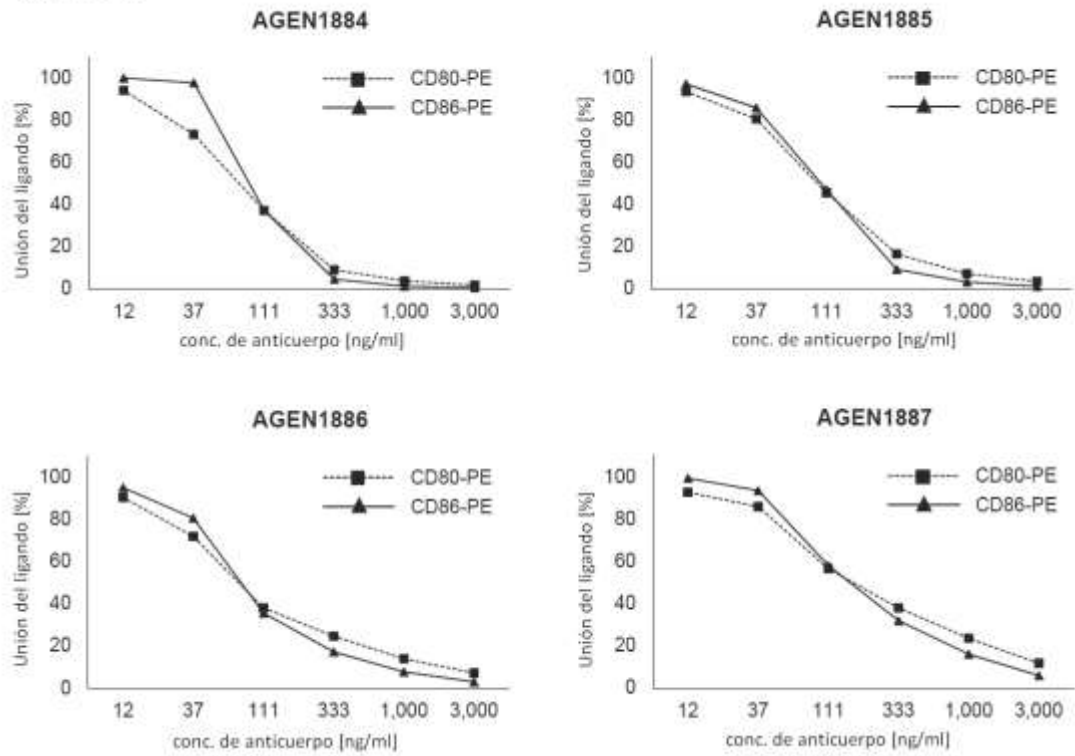


Figura 20B

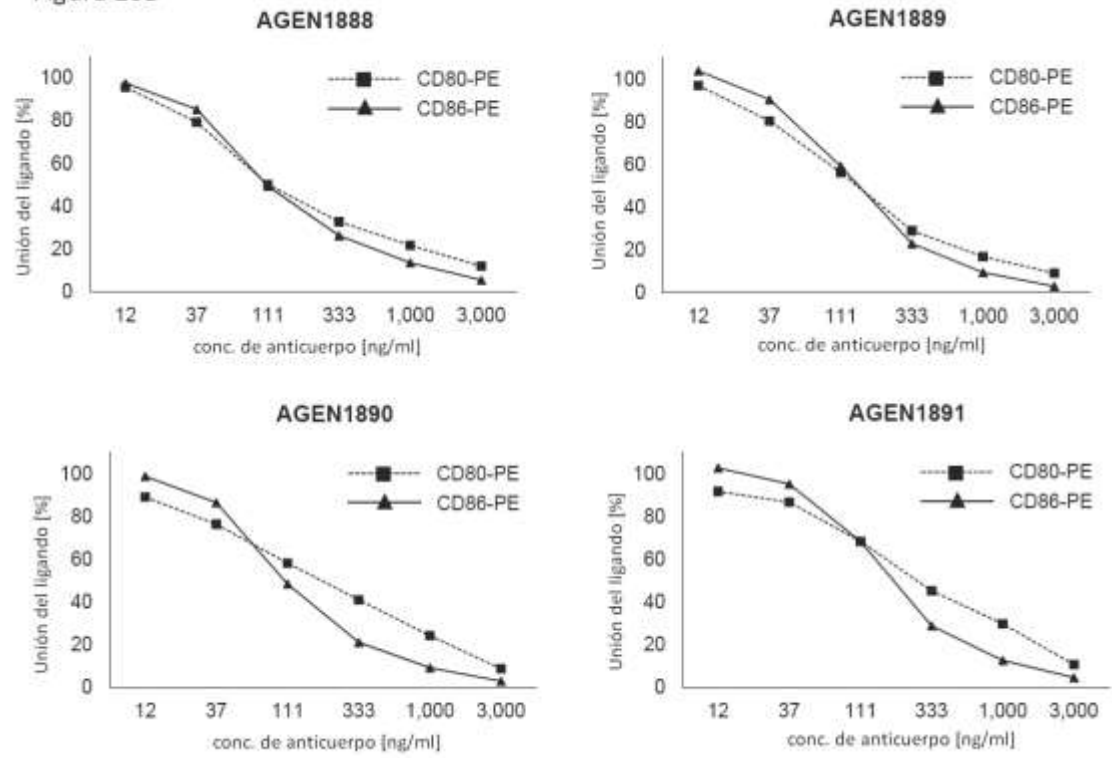


Figura 20C

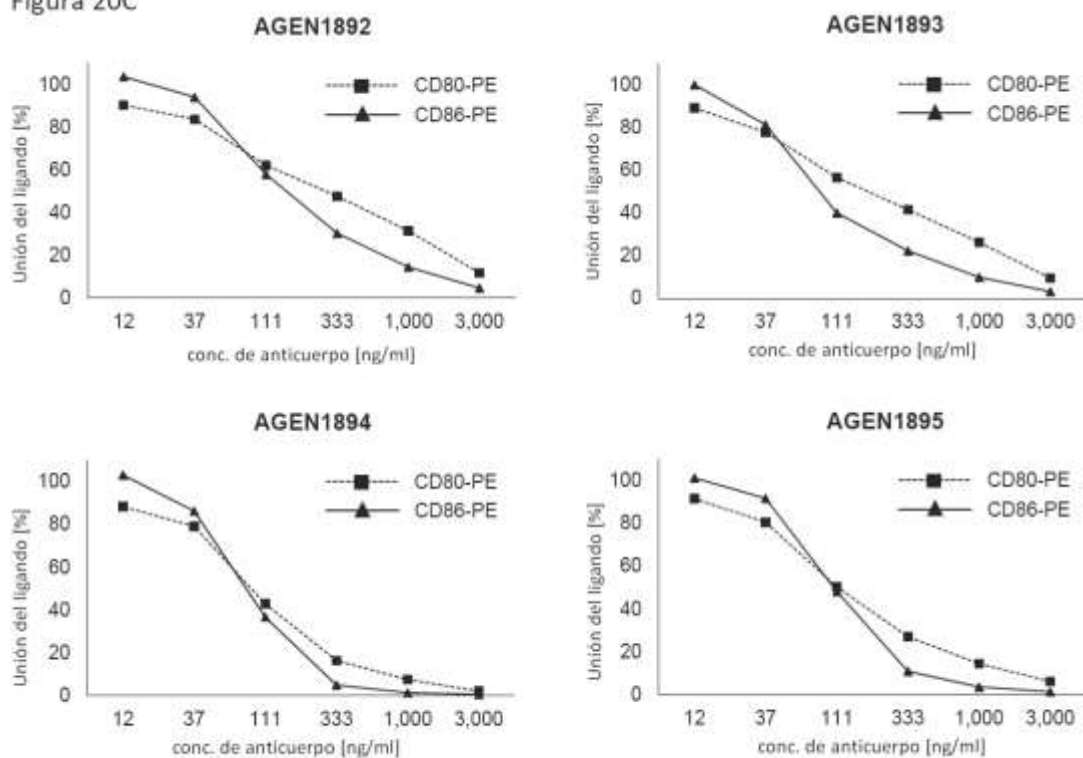


Figura 20D

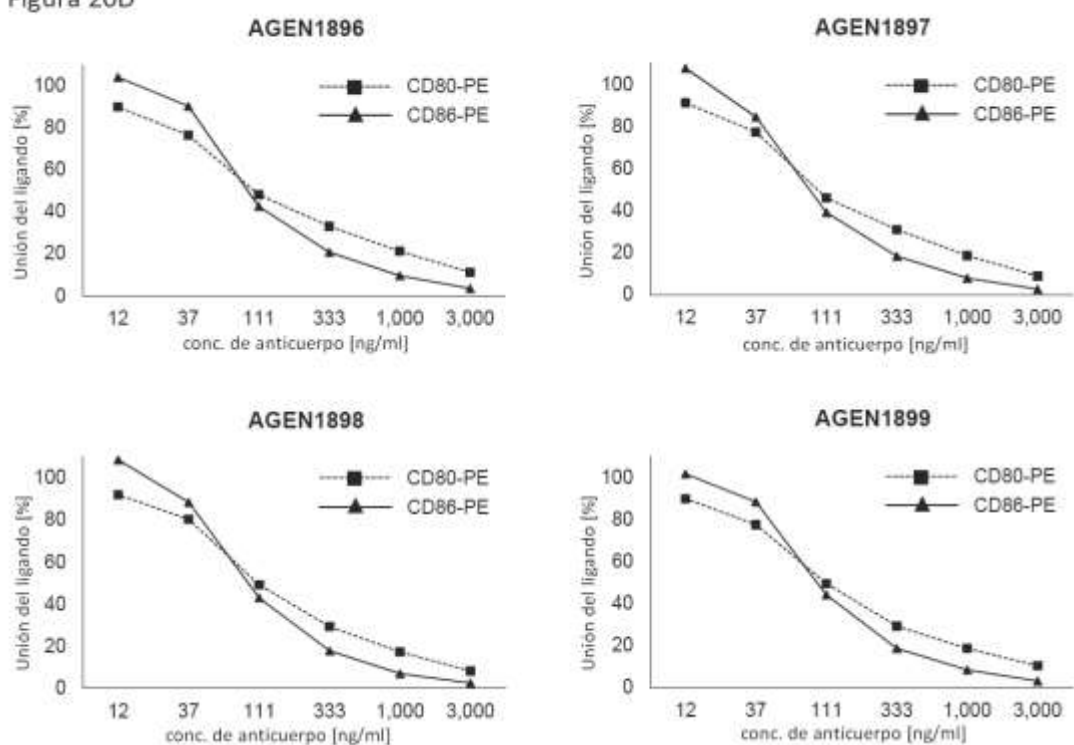


Figura 20E

