

ANTICUERPOS ANTI ANTÍGENO 4 DEL LINFOCITO T CITOTÓXICO (CTLA-4) ACTIVABLES Y SUS USOS

Antecedentes de la Invención

5 El sistema inmunológico es capaz de controlar el desarrollo del tumor y mediar la regresión del tumor. Esto requiere la generación y activación de células T específicas de antígenos tumorales. Múltiples receptores coestimuladores de células T y reguladores negativos de las células T, o
10 receptores coinhibidores, actúan en conjunto para controlar la activación, proliferación y ganancia o pérdida de la función efectora de las células T. Entre las moléculas coestimuladoras y coinhibidoras de células T más tempranas y mejor caracterizadas se encuentran CD28 y CTLA-4. Rudd *et al.*
15 (2009) *Immunol. Rev.* 229: 12. CD28 proporciona señales coestimuladoras para el acoplamiento del receptor de células T mediante la unión a ligandos B7-1 y B7-2 en células presentadoras de antígeno, mientras que CTLA-4 proporciona una proliferación y función de células T reguladoras por
20 disminución de la señal negativa. CTLA-4, que también se une a los ligandos B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) pero con mayor afinidad que CD28, actúa como un regulador negativo de la función de las células T tanto a través de vías de células autónomas (o intrínsecas) y células no autónomas (o
25 extrínsecas). El control intrínseco de la función efectora

(T_{eff}) de CD8 y CD4 T está mediado por la expresión de superficie inducible de CTLA-4 como resultado de la activación de células T, y la inhibición de la proliferación de células T y proliferación de citoquinas mediante el
 5 acoplamiento multivalente de ligandos B7 en células oponentes. Peggs et al. (2008) *Immunol. Rev.* 224:141.

Los anticuerpos anti-CTLA-4, cuando están reticulados, suprimen la función de las células T *in vitro*. Krummel & Allison (1995) *J. Exp. Med.* 182:459; Walunas et al.
 10 (1994) *Immunity* 1:405. Las células T reguladoras (T_{regs}), que expresan CTLA-4 en forma constitutiva, controlan la función de células T efectoras (T_{eff}) de una manera no autónoma de célula. Las T_{regs} que son deficientes para CTLA-4 tienen capacidad supresora alterada (Wing et al. (2008) *Science*
 15 322:271) y los anticuerpos que bloquean la interacción de CTLA-4 con B7 pueden inhibir la función de T_{reg} (Read et al. (2000) *J. Exp. Med.* 192:295; Quezada et al. (2006) *J. Clin. Invest.* 116:1935). Más recientemente, las T_{effs} también han demostrado controlar la función de las células T a través de
 20 vías extrínsecas (Corse & Allison (2012) *J. Immunol.* 189:1123; Wang et al. (2012) *J. Immunol.* 189:1118). El control extrínseco de la función las células T por T_{regs} y T_{effs} se produce a través de la capacidad de las células CTLA-4 positivas para eliminar los ligandos B7 en las células
 25 presentadoras de antígeno, de este modo se limita su

potencial coestimulador. Qureshi *et al.* (2011) *Science* 332: 600; Onishi *et al.* (2008) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 105:10113. El bloqueo de anticuerpos de las interacciones de CTLA-4/B7 se considera que promueve la activación de T_{eff} mediante la interferencia con las señales negativas transmitidas por el acoplamiento de CTLA-4; este control intrínseco de la activación y proliferación de las células T puede promover la proliferación de T_{eff} y T_{reg} (Krummel & Allison (1995) *J. Exp. Med.* 182:459; Quezada *et al.* (2006) *J. Clin. Invest.* 116:1935). En estudios tempranos con modelos animales, el bloqueo de anticuerpos de CTLA-4 se demostró para exacerbar la autoinmunidad. Perrin *et al.* (1996) *J. Immunol.* 157:1333; Hurwitz *et al.* (1997) *J. Neuroimmunol.* 73:57. Mediante la extensión a la inmunidad tumoral, la capacidad de anti-CTLA-4 para causar la regresión de los tumores establecidos proporcionó un ejemplo espectacular del potencial terapéutico del bloqueo de CTLA-4. Leach *et al.* (1996) *Science* 271:1734.

Se seleccionaron anticuerpos humanos para CTLA-4 humano, ipilimumab y tremelimumab, para inhibir las interacciones de CTLA-4-B7 (Keler *et al.* (2003) *J. Immunol.* 171:6251; Ribas *et al.* (2007) *Oncologist* 12:873) y se han analizado en una variedad de ensayos clínicos para múltiples tumores malignos. Hoos *et al.* (2010) *Semin. Oncol.* 37:533; Ascierto *et al.* (2011) *J. Transl. Med.* 9:196. Se observaron

con frecuencia regresiones tumorales y estabilización de la enfermedad, y el tratamiento con estos anticuerpos se ha acompañado de eventos adversos con infiltrados inflamatorios capaces de afectar una variedad de sistemas de órganos. En 5 2011, ipilimumab, que tiene una región constante de IgG1, se aprobó en los Estados Unidos de América y la Unión Europea para el tratamiento del melanoma no resecable o metastásico basado en una mejora en la supervivencia general en un ensayo de fase III de pacientes previamente tratados con melanoma 10 avanzado. Hodi et al. (2010) *N. Engl. J. Med.* 363:711.

El tratamiento con ipilimumab, sin embargo, ha sido obstaculizado por toxicidades limitantes de dosis, tal como colitis. Di Giacomo et al. (2010) *Seminars in Oncology* 37:499. Por consiguiente, existe la necesidad de anticuerpos anti- 15 CTLA-4 mejorados, tales como formas modificadas de ipilimumab, con toxicidad reducida pero con eficacia antitumoral comparable. Tales anticuerpos anti-CTLA-4 mejorados pueden ser agentes antitumorales más eficaces que los anticuerpos actuales.

20

Breve Descripción de la Invención

En la presente se proporcionan anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables que comprenden una cadena pesada que comprende un dominio VH y una cadena liviana que comprende un resto enmascarador (MM), un resto escindible (CM), y un 25 dominio VL. Tales anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables

tienen actividad de unión a CTLA-4 en el microambiente tumoral, donde el resto enmascarador se elimina por escisión proteolítica del resto escindible por proteasas específicas del tumor, pero exhiben una unión muy reducida a CTLA-4 fuera
 5 del tumor. De esta manera los anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables de la presente invención retienen actividad antitumoral mientras que reducen los efectos secundarios asociados con actividad anti-CTLA-4 fuera del tumor.

En la presente se proporcionan anticuerpos anti-
 10 CTLA-4 mejorados, tales como un ipilimumab mejorado, en particular un anticuerpo activable que cuando se activa se une al antígeno 4 del linfocítico T citotóxico. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 humano activable comprende:

15 (i) una cadena pesada que comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende regiones determinantes de complementariedad (CDRs) CDRH1: SYTMH (SEQ ID NO: 557); CDRH2: FISYDGNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 558); y CDRH3: TGWLGPFDY (SEQ ID NO: 559); y

20 (ii) una cadena liviana que comprende:

(a) un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende CDRL1: RASQSVGSSYLA (SEQ ID NO: 560); CDRL2: GAFSRAT (SEQ ID NO: 561); y CDRL3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 562);

25 (b) un resto escindible (CM); y

(c) un resto enmascarador (MM),

donde la cadena liviana tiene la disposición estructural desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal como sigue: MM-CM-VL.

5 En algunas modalidades, un anticuerpo anti-CTLA-4 humano activable comprende:

(i) una cadena pesada que comprende un dominio variable de la cadena pesada (VH) que comprende CDRH1: SYTMH (SEQ ID NO: 557); CDRH2: FISYDGNNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 558);
10 y CDRH3: TGWLGPFDY (SEQ ID NO: 559); y

(ii) una cadena liviana que comprende, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal:

(a) un resto enmascarador (MM);

(b) un resto escindible (CM); y

15 (c) un dominio variable de la cadena liviana (VL) que comprende CDRL1: RASQSVGSSYLA (SEQ ID NO: 560); CDRL2: GAFSRAT (SEQ ID NO: 561); y CDRL3: QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 562).

En algunas modalidades, el anticuerpo activable
20 comprende una cadena pesada y una cadena liviana de modo que la cadena liviana tiene la disposición estructural, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de la cadena liviana, MM-CM-VL. Como se usa en la presente, el fragmento N-terminal que se une al dominio VL se denomina como el predominio y
25 comprende MM y CM.

En algunas modalidades, el anticuerpo activable comprende un anticuerpo completo, es decir, un anticuerpo que comprende dos cadenas pesadas de longitud completa maduras y dos cadenas livianas de longitud completa maduras. En algunas modalidades, el anticuerpo activable comprende un fragmento Fab, un fragmento $F(ab')_2$, un scFv o un scAb. En algunas modalidades, el anticuerpo activable comprende un anticuerpo monoclonal.

En algunas modalidades, el CM funciona como un sustrato para una proteasa. En algunas modalidades, el CM se selecciona del grupo de CMs provistos en la Tabla 3. En algunas modalidades, el CM se selecciona del grupo que consiste en 2001 (SEQ ID NO: 297), 2003 (SEQ ID NO: 298), 2005 (SEQ ID NO: 299), 2006 (SEQ ID NO: 300), 2007 (SEQ ID NO: 301), 2008 (SEQ ID NO: 302), 2009 (SEQ ID NO: 303), 2011 (SEQ ID NO: 304), 2012 (SEQ ID NO: 305), 3001 (SEQ ID NO: 306), 3006 (SEQ ID NO: 307), 3007 (SEQ ID NO: 308), 3008 (SEQ ID NO: 309), 3009 (SEQ ID NO: 310), 3011 (SEQ ID NO: 311), y 3012 (SEQ ID NO: 312). En algunas modalidades, el CM es 2001 (SEQ ID NO: 297). En algunas modalidades, el CM es 2011 (SEQ ID NO: 304). En algunas modalidades, el CM es 2012 (SEQ ID NO: 305).

En algunas modalidades, el MM se selecciona del grupo que consiste en los MMs provistos en las Tablas 4-6. En algunas modalidades, el MM se selecciona del grupo que

consiste en YV01 (SEQ ID NO: 1), YV02 (SEQ ID NO: 2), YV03, (SEQ ID NO: 3), YV04 (SEQ ID NO: 4), YV09, (SEQ ID NO: 9), YV23 (SEQ ID NO: 23), YV24 (SEQ ID NO: 24), YV35 (SEQ ID NO: 35), YV39 (SEQ ID NO: 39), YV51 (SEQ ID NO: 51), YV61 (SEQ ID NO: 60), YV62 (SEQ ID NO: 61), YV63 (SEQ ID NO: 62), YV64 (SEQ ID NO: 63), YV65 (SEQ ID NO: 64), y YV66 (SEQ ID NO: 65); y el CM se selecciona del grupo que consiste en 2001, 2006, 2007, 2008, 2009, 2011, y 2012. En algunas modalidades, el MM es YV39 y el CM es 2011. En algunas modalidades, el MM es YV39 y el CM es 2012. En algunas modalidades, el MM es YV39 y el CM es 2001.

En algunas modalidades, el anticuerpo activable comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 353 y una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 356 a 529.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden una cadena liviana que tiene un prodominio y VL correspondiente al prodominio y VL de la SEQ ID NOs: 356 a 529. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden una cadena liviana que tiene un prodominio y VL de la SEQ ID NOs: 564, 565, o 563. En una modalidad, el anticuerpo anti-CTLA-4 activable comprende una cadena liviana que tiene un prodominio y VL de la SEQ ID NO: 564.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticas a la SEQ ID NO: 345. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden una secuencia de aminoácidos del dominio variable de la cadena liviana que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 564, 565, y 563.

En algunas modalidades, el anticuerpo activable comprende una combinación de secuencia de la cadena pesada SEQ ID NO: 353 y secuencia de la cadena liviana SEQ ID NO: 449, 473, o 383. En algunas modalidades, el anticuerpo activable comprende una combinación de secuencia de la cadena pesada SEQ ID NO: 349 y secuencia de la cadena liviana SEQ ID NO: 448, 472, o 382.

En la presente se proporciona un anticuerpo anti-CTLA-4 activable que, cuando se activa, se une específicamente al CTLA-4 humano y se denomina como un anticuerpo anti-CTLA-4 activable activado. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 activable activado se une a CTLA-4 con la misma afinidad de unión que ipilimumab. En la presente también se proporciona un anticuerpo anti-CTLA-4 activable que no se une a CTLA-4 tan efectivamente

como ipilimumab debido a que el anticuerpo anti-CTLA-4 activable comprende una cadena pesada y una cadena liviana que comprende un prodominio que comprende un MM y CM ligados a la cadena liviana de ipilimumab de modo que el prodominio
5 reduce la capacidad del ipilimumab para unir a CTLA-4

En algunas modalidades, el anticuerpo activable se une a CTLA-4 humano con una EC_{50} de 1 $\mu\text{g/mL}$ o más alto como se mide por citometría de flujo. En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables se unen a CTLA-4 con una
10 EC_{50} de 5 $\mu\text{g/mL}$ o mayor, 10 $\mu\text{g/mL}$ o mayor, 20 $\mu\text{g/mL}$ o mayor, o 40 $\mu\text{g/mL}$ o mayor.

En algunas modalidades, el MM es un polipéptido de no más de 40 aminoácidos de longitud. En algunas modalidades, el MM es un polipéptido que es no más de 50% idéntico a
15 cualquier ligando natural del anticuerpo. En algunas modalidades, el MM no comprende más de 25% de identidad de la secuencia de aminoácidos con CTLA-4. En algunas modalidades, el MM no comprende más de 10% identidad de la secuencia de aminoácidos con CTLA-4.

20 Los anticuerpos anti-CTLA-4 activables de la descripción se activan cuando el resto escindible es escindido por una proteasa. En algunas modalidades, la proteasa es producida por un tumor que está proximidad a las células T que expresan CTLA-4. En algunas modalidades, la
25 proteasa es producida por un tumor que está co-localizado con

las células T que expresan CTLA-4. En algunas modalidades, la proteasa se selecciona del grupo de proteasas provista en la Tabla 1 proporcionada a continuación. En algunas modalidades, la proteasa se selecciona del grupo que consiste en una

5 metaloproteasa de matriz (MMP), una trombina, una elastasa de neutrófilos, una cisteína proteasa, una legumina y una serina proteasa, tal como una matriptasa o una uroquinasa (uPA). En algunas modalidades, la proteasa se selecciona del grupo que consiste en MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9, MMP11, MMP13, MMP14,

10 MMP17, legumina, matriptasa y uPA, o una combinación de una o más de tales proteasas. En algunas modalidades, el CM se escinde mediante una metaloproteasa de matriz (MMP) y una serina proteasa. En algunas modalidades, el CM se escinde mediante una metaloproteasa de matriz (MMP), una serina

15 proteasa y una legumina.

Tabla 1: Ejemplos de proteasas y/o enzimas

20	ADAMS, ADAMTS, <i>e.g.</i> ADAM8 ADAM9 ADAM10 ADAM12 ADAM15	Cisteína proteinasas, <i>por ejemplo</i> , Cruzipaina Legumina Otubaina-2	Serina proteasas, <i>por ejemplo</i> , proteína C activada Catepsina A Catepsina G Quimasa
	ADAM17/TACE	KLKs, <i>por ejemplo</i> , KLK4	Proteasas de factor de coagulación (<i>por ejemplo</i> , FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)
	ADAMDEC1	KLK5	
	ADAMTS1	KLK6	Elastasa
	ADAMTS4	KLK7	Granzima B
	ADAMTS5	KLK8	Guanidinobenzoatasa
		KLK10	HtrA1
	Aspartato proteasas, <i>por ejemplo</i> ,	KLK11	Elastasa de neutrófilos humanos
25			

5	BACE Renina	KLK13 KLK14	Lactoferrina
			Marapsina NS3/4A PACE4
	Catepsinas aspárticas, <i>por ejemplo</i> , Catepsina D Catepsina E	Metaloproteinasas, <i>por ejemplo</i> , Meprina Neprilisina PSMA BMP-1	Plasmina PSA tPA Trombina
	Caspasas, <i>por ejemplo</i> , Caspasa 1 Caspasa 2 Caspasa 3 Caspasa 4 Caspasa 5		Triptasa uPA
		MMPs, <i>por ejemplo</i> , MMP1 MMP2 MMP3	Tipo II Serina Proteasas de transmembrana (TTSPs), <i>por ejemplo</i> , DESC1 DPP-4 FAP Hepsina Matriptasa-2 MT-SP1/Matriptasa TMPRSS2 TMPRSS3
10	Caspasa 6 Caspasa 7 Caspasa 8 Caspasa 9 Caspasa 10 Caspasa 14	MMP7 MMP8 MMP9 MMP10 MMP11 MMP12 MMP13 MMP14	TMPRSS4
	Cisteína catepsinas, <i>por ejemplo</i> , Catepsina B Catepsina C Catepsina K Catepsina L Catepsina S Catepsina V/L2 Catepsina X/Z/P	MMP15 MMP16 MMP17 MMP19 MMP20 MMP23 MMP24 MMP26 MMP27	
15			

20 En la presente se proporcionan anticuerpos anti-CTLA-4 activables que también comprenden uno o más péptidos ligadores. En algunas modalidades, el péptido ligador está entre el MM y el CM. En algunas modalidades, el péptido ligador está entre el CM y el VL. En algunas modalidades, el anticuerpo activable comprende un primer péptido ligador

25

- (LP1) y un segundo péptido ligador (LP2). En algunas modalidades, el anticuerpo activable comprende una cadena pesada y una cadena liviana de modo que la cadena liviana tiene la disposición estructural, desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de la cadena liviana, MM-LP1-CM-LP2-VL. En algunas modalidades, el LP1 y el LP2 no son idénticos entre sí. En algunas modalidades, el LP1 y el LP2 son idénticos entre sí. En algunas modalidades, el prodominio comprende MM-LP1-CM-LP2.
- En algunas modalidades, el LP1 y/o el LP2 comprenden un polímero glicina-serina. En algunas modalidades, el LP1 y/o el LP2 comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (GS) n (SEQ ID NO: 532), (GGS) n (SEQ ID NO: 533), (GSGGS) n (SEQ ID NO: 534), y (GGGS) n (SEQ ID NO: 535), donde n es un número entero de al menos uno. En algunas modalidades, el LP1 comprende la secuencia de aminoácidos GGGSSGGS (SEQ ID NO: 542). En algunas modalidades, el LP2 comprende la secuencia de aminoácidos GGGS (SEQ ID NO: 543).
- En la presente se proporcionan anticuerpos anti-CTLA-4 activables que también comprenden un espaciador. En algunas modalidades, el espaciador se une directamente al MM y tiene la disposición estructural del extremo N-terminal al extremo C-terminal como sigue: espaciador-MM-CM-VL. En algunas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de

aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en QGQSGQG (SEQ ID NO: 544), GQSGQG (SEQ ID NO: 545), QGQSGS (SEQ ID NO: 546), QGQSGQ (SEQ ID NO: 547), QSGQG (SEQ ID NO: 548), GQSGS (SEQ ID NO: SEQ ID NO: 549), QGQSG (SEQ ID NO: 550), SGQG
 5 (SEQ ID NO: 551), QSGS (SEQ ID NO: 552), QGQS (SEQ ID NO: 553), GQG, SGS, QGQ, QG, GS, G, S, y Q. En algunas modalidades, el espaciador y el MM comprenden la secuencia de aminoácidos QGQSGSCRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 556).

En la presente también se proporcionan anticuerpos
 10 activables que comprenden un agente tóxico, tal como una dolastatina, una auristatina, una auristatina E, una monometil auristatina E (MMAE), un maitansinoide, una duocarmicina, una caliqueamicina, una pirrolobenzodiazepina o uno de sus derivados. En algunas modalidades, el agente
 15 tóxico se conjuga con el anticuerpo activable a través de un ligador. En algunas modalidades, el ligador es un ligador escindible. En algunas modalidades, el ligador es un ligador no escindible.

En la presente se proporcionan anticuerpos anti-
 20 CTLA-4 activables que comprenden un resto detectable. En algunas modalidades, el resto detectable es un agente de diagnóstico.

En la presente se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-CTLA-4
 25 activable descrito en la presente. En algunas modalidades, la

composición farmacéutica comprende un agente terapéutico adicional.

En la presente también se proporcionan molécula de ácido nucleicos aislado que codifica las cadenas pesadas y/o livianas de los anticuerpos anti-CTLA-4 activables descritos en la presente, los vectores que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico aisladas, y métodos de producir un anticuerpo activable mediante el cultivo de una célula que comprende el vector o vectores en condiciones que producen la expresión del anticuerpo activable.

En la presente se proporcionan métodos de producción de un anticuerpo activable, el método que comprende: (a) cultivar una célula que comprende un constructo de ácido nucleico que codifica el anticuerpo activable descrito en la presente en condiciones que producen la expresión del anticuerpo activable, y (b) recuperar el anticuerpo activable.

En la presente se proporcionan métodos de reducción de la actividad de CTLA-4 que comprende administrar una cantidad efectiva del anticuerpo activable descrito en la presente o composiciones farmacéuticas que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 activable descrito en la presente a un sujeto que lo necesita.

En la presente se proporcionan métodos de bloqueo de un ligando natural a CTLA-4 que comprende administrar una

cantidad efectiva de los anticuerpos activables descritos en la presente o composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-CTLA-4 activable descrito en la presente a un sujeto que lo necesita.

5 En la presente se proporcionan métodos de tratamiento, alivio de un síntoma de, o retraso de la progresión de un trastorno relacionado con CTLA-4 que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de los anticuerpos activables descritos en la presente o las
10 composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-CTLA-4 activable descrito en la presente a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el trastorno relacionado con CTLA-4 es un cáncer En algunas modalidades, el cáncer es un melanoma, tal como melanoma no resecable o metastásico,
15 cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer gástrico, glioblastoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer renal, sarcoma o cáncer de piel. En algunas modalidades, el trastorno relacionado con CTLA-4
20 es un trastorno que se sabe que es tratable con ipilimumab.

Cuando los aspectos o modalidades de la invención se describen en términos de un grupo Markush u otra agrupación de alternativas, la presente invención abarca no solo al grupo entero enumerado como un todo, sino también a
25 cada miembro del grupo individualmente y a todos los posibles

subgrupos. del grupo principal, y también el grupo principal ausente uno o más de los miembros del grupo. La presente invención también contempla la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros del grupo en la invención reivindicada.

Breve Descripción de las Figuras

Las FIGs. 1A a 1C muestran los volúmenes tumorales en función de los días pos-implante tumoral en ratones (n = 10) tratados con (i) un anticuerpo IgG2a de ratón no relacionado (FIG. 1A), (ii) un anticuerpo IgG2a anti-CTLA-4 (9D9) de ratón (FIG. 2B), o (iii) un anticuerpo 9D9 activable (FIG. 1C). Todos los anticuerpos y anticuerpos activables se dosificaron a 25 µg/ratón. El anticuerpo 9D9 activable comprende MY11 (SEQ ID NO: 294) como el resto enmascarador y 2001 (SEQ ID NO: 297) como el resto escindible. "TF" indica la cantidad de ratones libres de tumor al final de cada experimento. El anticuerpo IgG2a de ratón no relacionado y el anticuerpo IgG2a anti-CTLA-4 (9D9) de ratón se usaron como controles.

Las FIGs. 2A a 2C muestran la frecuencia de células T reguladoras en el tumor (FIG. 2A) y proliferación y activación de células T reguladoras en el bazo (FIGs. 2B y 2C) de ratones tratados con diferentes anticuerpos IgG2a anti-CTLA-4 (9D9) activables de ratón. Los diferentes anticuerpos 9D9 activables comprende (i) MY03 (SEQ ID NO:

293) o MY11 (SEQ ID NO: 294) como el resto enmascarador y (2) 0003 (SEQ ID NO: 320), 1004 (SEQ ID NO: 323), o 2001 (SEQ ID NO: 297) como el resto escindible. El anticuerpo IgG2a de ratón no relacionada ("DT 1D12 mg2a") y el anticuerpo IgG2a anti-CTLA-4 (9D9) de ratón ("9D9 mg2a") se usaron como controles. En la FIG. 2A, la frecuencia de células T reguladoras se muestra como porcentaje de células T CD4+ totales que son Foxp3+ en el tumor. Las FIGs. 2B y 2C muestran la frecuencia de células T reguladoras proliferantes (Ki-67+) y activadas (ICOS+), como un porcentaje de células T Foxp3+, en el bazo, respectivamente.

Las FIGs. 3A a 3E muestran la capacidad de diferentes anticuerpos anti-CTLA-4 activables (isotipo IgG1 humano) para unirse a CTLA-4 humano, medido *in vitro* con un ensayo de unión ELISA. Ipilimumab ("YV1") se usó como un control en todos los experimentos. En la FIG. 3A, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV04 (SEQ ID NO: 4), YV06 (SEQ ID NO: 6), YV09 (SEQ ID NO: 9), o YV23 (SEQ ID NO: 23) como el resto enmascarador. En la FIG. 3B, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV27 (SEQ ID NO: 27), YV29 (SEQ ID NO: 29), YV32 (SEQ ID NO: 32), o YV33 (SEQ ID NO: 33) como el resto enmascarador. En la FIG. 3C, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV35 (SEQ ID NO: 35) o YV41 (SEQ ID NO: 41) como el resto enmascarador. En la FIG. 3D, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables

comprenden YV24 (SEQ ID NO: 24), YV39 (SEQ ID NO: 39), YV51 (SEQ ID NO: 51), YV52 (SEQ ID NO: 52), o YV53 (SEQ ID NO: 53) como el resto enmascarador. En la FIG. 3E, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV54 (SEQ ID NO: 54), YV55 (SEQ ID NO: 55), YV56 (SEQ ID NO: 56), YV57 (SEQ ID NO: 57), o YV58 (SEQ ID NO: 58) como el resto enmascarador. En las FIGs. 3A a 3E, todos los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden 2001 (SEQ ID NO: 297) como el resto escindible.

Las FIGs. 4A a 4D muestran la capacidad de los anticuerpos anti-CTLA-4 activables adicionales (isotipo IgG1 humano) para unirse al CTLA-4 humano, medido *in vitro* con un ensayo de unión ELISA. Ipilimumab ("YV1") se usó como un control en todos los experimentos. En la FIG. 4A, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV04, YV06, YV09, YV23, YV27, o YV29 como el resto enmascarador. En la FIG. 4B, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV32, YV33, YV35, o YV41 como el resto enmascarador. En la FIG. 4C, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV24, YV39, YV51, YV52, o YV53 como el resto enmascarador. En la FIG. 4D, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV54, YV55, YV56, YV57, o YV58 como el resto enmascarador. En las FIGs. 4A a 4D, todos los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden 3001 como el resto escindible.

Las FIGs. 5A a 5F muestran la capacidad de varios anticuerpos anti-CTLA-4 activables (isotipo IgG2a de ratón)

para unirse al CTLA-4 humano, medido *in vitro* con un ensayo de unión ELISA. Ipilimumab ("YV1") se usó como un control. En la FIG. 5A, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV04 como el resto enmascarador y 2001 (SEQ ID NO: 297), 2006 (SEQ ID NO: 300), 2007 (SEQ ID NO: 301), 2008 (SEQ ID NO: 302), o 2009 (SEQ ID NO: 303) como el resto escindible. En la FIG. 5B, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV04 o YV23 como el resto enmascarador, y 2001, 2006, 2007, 2008, o 2009 como el resto escindible. En la FIG. 5C, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV39 como el resto enmascarador y 2001, 2006, 2008, o 2009 como el resto escindible. En la FIG. 5D, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV61 (SEQ ID NO: 60), YV62 (SEQ ID NO: 61), YV63 (SEQ ID NO: 62), YV64 (SEQ ID NO: 63), o YV39 (SEQ ID NO: 39) como el resto enmascarador y 2001 o 2012 como el resto escindible. En la FIG. 5E, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV65 (SEQ ID NO: 64), YV66 (SEQ ID NO: 65), YV01 (SEQ ID NO: 1), YV02 (SEQ ID NO: 2), o YV39 (SEQ ID NO: 39) como el resto enmascarador y 2001 o 2012 como el resto escindible. En la FIG. 5F, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV39 o YV03 (SEQ ID NO: 3) como el resto enmascarador y 2001 o 2012 como el resto escindible.

Las FIGs. 6A y 6B comparan la capacidad de los anticuerpos anti-CTLA-4 activables que tienen un isotipo IgG2a de ratón (FIG. 6A) o isotipo IgG1 humano (FIG. 6B) para

unirse al CTLA-4 humano, medido *in vitro* con un ensayo de unión ELISA. Ipilimumab ("YV1") se usó como un control. En ambas FIGs. 6A y 6B, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV39 como el resto enmascarador y 2001, 2008, 2011, 5 o 2012 como el resto escindible. En un anticuerpo modificado de la descripción (YV39-NSUB), el resto escindible se reemplazó con un ligador resistente a la proteasa ("NSUB") que comprende la secuencia de aminoácidos GGSGGSGGGSGGGS (SEQ ID NO: 570).

10 Las FIGs. 7A a 7D muestran la capacidad de los diferentes anticuerpos anti-CTLA-4 activables para unir 58 células α - β que sobreexpresan CTLA-4 humano, tal como se mide mediante citometría de flujo. La unión se presenta como unidades de fluorescencia arbitrarias (intensidad de 15 fluorescencia media, MFI o intensidad de fluorescencia media geométrica, gMFI) en función de la concentración de anticuerpo anti-CTLA-4 añadido. En la FIG. 7A, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV04, YV23, YV24 o YV39 como resto enmascarador y 2001 como el resto 20 escindible. En la FIG. 7B, los anticuerpos activables anti-CTLA-4 comprenden YV61, YV62, YV64, o YV39 como el resto enmascarador y 2001 o 2011 como el resto escindible. En la FIG. 7C, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV39 como el resto enmascarador y para el resto escindible, 25 2011 ("Ipi YV39 2011") o tres variantes de Ipi YV39 2011: (i)

mono-cortado ("Ipi YV39 MMP monocortado"), (ii) completamente cortado por MMP ("Ipi YV39 MMP"), o (iii) completamente cortado por uPA ("Ipi YV39 2011 uPA"). La FIG. 7D proporciona los valores EC50 para los diferentes anticuerpos activables mostrados en la FIG. 7C. Ipilimumab se usó como un control para las FIGs. 7A a 7D.

La FIG. 8 muestra la actividad del anticuerpo anti-CTLA-4 activable que comprende YV39 como el resto enmascarador y 2011 como el resto escindible ("Ipi YV39 2011") (cuadrado) a diferentes concentraciones, como se midió *in vitro* con un ensayo SEB [por sus siglas en inglés] (enterotoxina B estafilocócica). La actividad del anticuerpo se muestra por medio de la producción de IL-2 mediante los PBMC humanos después de la estimulación de SEB. Un isotipo IgG1 humano no relacionado (triángulo), ipilimumab (círculo), y SEB solo estimulación (marca X) se usaron como controles.

Las FIGs. 9A a 9F muestran el volumen tumoral en función de los días después del implante del tumor en ratones activados en CTLA-4 humano (n = 10) tratados con diferentes anticuerpos activables anti-CTLA-4 humano (isotipo IgG2a de ratón) dosificados una vez a 10 mg/kg. Un anticuerpo IgG2a de ratón no relacionado (FIG. 9A) e ipilimumab con un isotipo IgG2a de ratón (FIG. 9B) se usaron como controles. En las FIGs. 9C a 9F, los anticuerpos activables comprenden YV04, YV23, YV24, e YV39, respectivamente, como el resto

enmascarador y 2001 como el resto escindible.

FIGs. 10A a 10F muestran el volumen tumoral en función de días después del implante del tumor en ratones activados CTLA-4 humano (n = 10) tratados con diferentes anticuerpos activables anti-CTLA-4 humano (isotipo IgG1 humano). Los anticuerpos se dosificaron una vez a 200 µg/ratón el día 7 posterior al implante. Un anticuerpo IgG1 humano no relacionado (FIG. 10A) e ipilimumab con un isotipo IgG1 humano (FIG. 10B) se usaron como controles. En las FIGs. 10C a 10F, los anticuerpos activables comprenden YV39 como resto enmascarador y 2001, 2012, 2011 o 2008 como el resto escindible. Los restos escindibles 2012, 2011 y 2008 se han modificado para superar un sitio de desamidación en 2001.

Las FIGs. 11A a 11G muestran volumen tumoral como una función de días pos-implantación del tumor en ratones activados CTLA-4 humano (n = 16) tratados con diferentes dosis de un anticuerpo anti-CTLA-4 activable que comprende YV39 como el resto enmascarador y 2011 como el resto escindible ("Ipi YV39 2011") (FIGs. 11E a 11G). El anticuerpo se dosificó una vez a 10 mg/kg (FIG. 11E), 3 mg/kg (FIG. 11F), o 1 mg/kg (FIG. 11G) en el día 7 pos-implantación del tumor. Los animales de control se trataron con ipilimumab (10 mg/kg, 3 mg/kg, o 1 mg/kg; FIGs. 11B a 11D, respectivamente) o un anticuerpo IgG1 humano no relacionado (FIG. 11A).

Las FIGs. 12A a 12D muestran la frecuencia de las

células T reguladoras en el tumor (FIGs. 12A y 12B) o el bazo (FIGs. 12C y 12D) en ratones activados CTLA-4 humano (n = 10) tratados con diferentes anticuerpos activables anti-CTLA-4 humano con un isotipo IgG2a de ratón. Todos los anticuerpos se dosificaron una vez a razón de 10 mg/kg. Los anticuerpos activables comprenden YV04, YV23, YV24, o YV39 como el resto enmascarador y 2001 como el resto escindible. Las marcas en las abscisas de las FIGs. 12C y 12D también se aplican a las FIGs. 12A y 12B, respectivamente. Un anticuerpo IgG1 humano no relacionado e ipilimumab con un isotipo IgG2a de ratón se usaron como controles. En la FIGs. 12A y 12C, la frecuencia de las células T reguladoras se muestra como un porcentaje de las células T CD4+ totales que son Foxp3+. En las FIGs. 12B y 12D, la frecuencia de las células T reguladoras se muestra como un porcentaje de células T CD45+ totales que son Foxp3+. Las FIGs. 12E y 12F muestran la frecuencia de células activadas (ICOS+) y células proliferantes (Ki-67+) que se muestra como un porcentaje de células T reguladoras en el bazo.

Las FIGs. 13A a 13C muestran la frecuencia de las células T reguladoras en el tumor (FIGs. 13A y 13B) o el bazo (FIGs. 13C) en ratones activados CTLA-4 humano tratados con el anticuerpo anti-CTLA-4 activable. El anticuerpo activable usado comprende YV39 como el resto enmascarador y fueron un isotipo IgG2a de ratón o isotipo IgG1 humano. Un anticuerpo

IgG1 humano no relacionado e ipilimumab con un isotipo IgG1 humano se usaron como controles. En las FIGs. 13A y 13C, la frecuencia de las células T reguladoras se muestra como un porcentaje de células T CD4+ totales que son Foxp3+. En la

5 FIG. 13B, la frecuencia de células T reguladoras se muestra como un porcentaje de células T CD45+ totales que son Foxp3+. Las FIGs. 13D y 13E muestran la frecuencia de células proliferantes (Ki-67+) y activadas (ICOS+) como un porcentaje de células T reguladoras en el bazo.

10 Las FIGs. 14A a 14C muestran la frecuencia de células T reguladoras (FIGs. 14A y 14B) o células efectoras T CD4+ (FIG. 14C) en los tumores de ratones tratados con diferentes anticuerpos anti-CTLA-4 activables. Las FIGs. 14D y 14E muestran las células T reguladoras en el bazo. Los

15 anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden YV39 como el resto enmascarador y 2012, 2011, 2008, o 2001 como el resto escindible. Un anticuerpo IgG1 humano no relacionado e ipilimumab con un isotipo IgG1 humano se usaron como

20 controles. En las FIGs. 14A y 14D, la frecuencia de células T reguladoras se muestra como un porcentaje de células T CD4+ totales que son Foxp3+. En la FIGs. 14B y 14E, la frecuencia de células T reguladoras se muestra como un porcentaje de células T CD45+ totales que son Foxp3+. La FIG. 14C muestra la frecuencia de células efectoras T CD4+ como un porcentaje

25 de las células T CD45+ totales en el tumor. Las FIGs. 14F y

14G muestran los porcentajes de células T reguladoras proliferantes (Ki-67+) y activadas (ICOS+) en el bazo.

La FIG. 15 muestra la frecuencia de células T reguladoras en los tumores de ratones activados CTLA-4 humano (n = 8) tratados con diferentes dosis de ipilimumab o un anticuerpo anti-CTLA-4 activable que comprende YV39 como el resto enmascarador y 2011 como el resto escindible ("Ipi YV39 2011"). Los anticuerpos se dosificaron una vez a 10 mg/kg, 3 mg/kg, o 1 mg/kg en el día 7 pos-implantación del tumor. Un anticuerpo IgG1 humano no relacionado se usó como un control.

Las FIGs. 16A y 16B muestran los porcentajes de células T reguladoras activadas (ICOS+) y proliferantes (Ki-67+) en el bazo de ratones activados CTLA-4 humano (n = 8) tratados con diferentes dosis de ipilimumab o un anticuerpo anti-CTLA-4 activable que comprende YV39 como el resto enmascarador y 2011 como el resto escindible ("Ipi YV39 2011"). Los anticuerpos se dosificaron una vez a 10 mg/kg, 3 mg/kg, o 1 mg/kg en el día 7 pos-implantación del tumor. Un anticuerpo IgG1 humano no relacionado se usó como un control.

Las FIGs. 17A a 17D muestran el volumen tumoral en función de los días pos-implantación del tumor en ratones activados CTLA-4 humano (n = 10) tratados con diferentes dosis de ipilimumab ("Ipi") (FIG. 17B), una versión no fucosilada de ipilimumab ("Ipi NF") (FIG. 17C), o una versión no fucosilada de un anticuerpo anti-CTLA-4 activable que

comprende YV39 como el resto enmascarador y 2011 como el resto escindible ("Ipi YV39 2011 NF") (FIG. 17D). Los anticuerpos se dosificaron una vez a 10 mg/kg, 3 mg/kg, o 1 mg/kg (panel izquierdo, panel medio, y panel derecho, respectivamente, en las FIGs. 17B a 17D). Los animales de control recibieron un anticuerpo IgG1 humano no relacionado (FIG. 17A).

La FIG. 18 muestra la frecuencia de las células T reguladoras en los tumores de ratones activados CTLA-4 humano (n = 5) tratados en la versión no fucosilada de ipilimumab ("Ipi NF") o una versión no fucosilada del anticuerpo anti-CTLA-4 activable que comprende YV39 como el resto enmascarador y 2011 como el resto escindible ("NF Ipi YV39 2011"). Los anticuerpos se dosificaron una vez a 200 µg/ratón en el día 7 pos-implantación del tumor. Un anticuerpo IgG1 humano no relacionado se usó como un control.

La FIG. 19 muestra las afinidades de unión (Kd) para ipilimumab ("Ipi") y una versión no fucosilada de ipilimumab ("Ipi NF") para varios receptores de Fc humanos, cyno, y ratón.

La FIG. 20 muestra el porcentaje medio de células T Ki67+ CD4+ en la sangre de monos cynomolgus después del tratamiento con un anticuerpo activable anti-CTLA-4. El anticuerpo activable anti-CTLA-4 comprende YV39 como el resto enmascarador y 2001 como el resto escindible. El vehículo y

el ipilimumab se usaron como controles.

Descripción Detallada de la Invención

Para que la presente descripción se pueda entender más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

Se debe observar que el término "un" o "una" entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, "una secuencia de nucleótidos" se entiende que representa una o más secuencias de nucleótidos. Como tal, los términos "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" se pueden usar indistintamente en la presente.

Además, "y/o" cuando se usa en la presente se debe tomar como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por lo tanto, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A y/o B" en la presente está destinado a incluir "A y B", "A o B", "A" (solo) y "B". "(solo)". Del mismo modo, el término "y/o" como se usa en una frase tal como "A, B y/o C" pretende abarcar cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Se entiende que los aspectos descritos en la presente se describen con la frase "que comprende", de lo contrario también se proporcionan aspectos análogos descritos

en términos de "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en".

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen
5 el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que se refiere esta descripción. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2.º ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3.º ed., 1999, Academic Press; y the
10 Oxford Dictionary Of Biochemistry and Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos utilizados en esta descripción.

Las unidades, los prefijos y los símbolos se
15 indican en su forma aceptada de Système International de Unites (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de nucleótidos se escriben de izquierda a derecha en una orientación de 5 'a 3'. Las secuencias de
20 aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi. Los títulos proporcionados en la presente no son limitaciones de los diversos aspectos de la descripción, que pueden tenerse por referencia a la especificación como un todo. En consecuencia, los términos
25 definidos inmediatamente a continuación se definen más

completamente por referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

El término "antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos" o "CTLA-4" como se usa en la presente se refiere a un receptor que es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas que se expresa mediante células T activadas y transmite una señal inhibidora a las células T. CTLA-4 es homólogo a la proteína coestimuladora de células T, CD28, y ambas moléculas se unen a CD80 y CD86, también llamadas B7-1 y B7-2 respectivamente, en las células presentadoras de antígeno. CTLA4 también se encuentra en las células T reguladoras y contribuye a su función inhibidora. CTLA-4 también se denomina como proteína asociada a linfocitos T citotóxicos 4, CD152, diabetes mellitus insulino dependiente 12 (IDDM12), enfermedad celíaca 3 (CELIAC3), GRD4 y GSE. El término "CTLA-4" incluye cualquier variante o isoforma de CTLA-4 que se expresa naturalmente en las células.

El término "célula T" como se usa en la presente se define como un linfocito derivado de timo que participa en una variedad de reacciones inmunológicas mediadas por células. El término "célula T reguladora" como se usa en la presente se refiere a una célula T CD4+CD25+FoxP3+ con propiedades supresoras. "Treg" es la abreviatura utilizada en la presente para una célula T reguladora.

El término "célula T auxiliar" como se usa en la

presente se refiere a una célula T CD4+; las células T auxiliares reconocen el antígeno unido a las moléculas MHC de Clase II. Hay al menos dos tipos de células T auxiliares, Th1 y Th2, que producen diferentes citoquinas. Las células T auxiliares se convierten en CD25+ cuando se activan, pero solo transitoriamente se convierten en FoxP3+.

El término "célula T citotóxica" como se usa en la presente se refiere a una célula T CD8+; las células T citotóxicas reconocen el antígeno unido a moléculas MHC de clase I.

El término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina (Ig), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente (inmunoreacciona con) un antígeno. Por "unir específicamente" o "inmunoreacciona con" o "unir inmuno-específicamente" se entiende que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona con otros polipéptidos o se une con una afinidad mucho menor ($K_d > 10^{-6}$). Los anticuerpos incluyen, pero sin limitación, fragmentos policlonales, monoclonales, quiméricos, dominio de anticuerpo, monocatenarios, Fab y F(ab')₂, scFvs y una biblioteca de expresión de Fab.

Se sabe que la unidad estructural básica de

anticuerpo comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "liviana" (aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. En general, las moléculas de anticuerpos obtenidas de los seres humanos se relacionan con cualquiera de las clases IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que difieren entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases también tienen subclases, tales como IgG1, IgG2 y otras. Además, en los seres humanos, la cadena liviana puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

Como se usa en la presente, el término "anticuerpo activable" se refiere a un anticuerpo que también comprende un resto enmascarador (MM) y un resto escindible (CM), donde el MM se une al VL del anticuerpo por medio del CM, que es escindible por una proteasa. Como se usa en la presente, un "prodominio" comprende el fragmento N-terminal que se une al dominio VL de los anticuerpos activables anti-CTLA-4 humano y, como tal, comprende los MM y CM. En algunas modalidades, la cadena liviana del anticuerpo activable tiene la disposición

estructural desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de la siguiente manera: MM-CM-VL. En algunas modalidades, el prodominio se une al dominio VH del anticuerpo anti-CTLA-4 humano. Un anticuerpo activable se diseña para ser escindido por la actividad proteolítica regulada por aumento en la mayor parte, si no en todos, los cánceres. Tal escisión proteolítica, o activación, elimina el prodominio y libera un anticuerpo activo, es decir, un anticuerpo activable activado. La activación de la proteasa de los anticuerpos activables en tejido normal se reduce significativamente debido al estricto control de la actividad proteolítica en tejidos normales. Como tales, los anticuerpos activables permanecen en gran medida inertes en la circulación y en los tejidos normales.

Un anticuerpo activable, en vista de su prodominio que enmascara el dominio de unión al antígeno, de este modo inhibe la capacidad del dominio de unión al antígeno para unirse a su blanco, tiene una afinidad menor por unirse al blanco que un anticuerpo activable activado, en el que el MM se ha eliminado por escisión proteolítica del CM, de este modo libera un anticuerpo activo. Tal anticuerpo liberado exhibe mayor afinidad por la unión a su blanco. En algunas modalidades, el MM interactúa específicamente con el dominio de unión al antígeno de ipilimumab para reducir la capacidad del anticuerpo para unirse a su blanco. Cuando el MM se elimina por escisión proteolítica del anticuerpo activable,

el anticuerpo liberado se une a su blanco con una afinidad similar al ipilimumab original.

Las representaciones esquemáticas de los anticuerpos activables de la presente invención, por ejemplo MM-CM-VL, no están destinados a ser exclusivos. Otros elementos de secuencia, tales como ligadores, espaciadores y secuencias de señal, pueden estar presentes antes, después o entre los elementos de secuencia enumerados en tales representaciones esquemáticas. También debe apreciarse que un prodominio que comprende un MM y un CM se puede unir a un VH de un anticuerpo en lugar de a un VL de un anticuerpo de manera que la cadena pesada tiene la disposición estructural desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal como sigue: MM-CM-VH.

El término "anticuerpo monoclonal" (mAb) o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solo una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un producto génico de cadena liviana único y un producto génico de cadena pesada único. En particular, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los MAb contienen un sitio de unión a antígeno, o dominio, capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular del antígeno

caracterizado por una afinidad de unión única por este. Las moléculas de anticuerpo monoclonal típicamente comprenderán dos cadenas pesadas y dos cadenas livianas.

El término "dominio de unión al antígeno" se
5 refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno está formado por residuos de aminoácidos de las regiones variables N-terminales ("V") de las cadenas pesada ("H") y liviana ("L"). Tres tramos altamente divergentes
10 dentro de las regiones V de las cadenas pesada y liviana, denominadas "regiones hipervariables", se interponen entre los tramos flanqueantes más conservados conocidos como "regiones estructurales" o "FR". Por lo tanto, el término "FR" se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran
15 naturalmente entre, y adyacentes a, regiones hipervariables en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena liviana y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada están dispuestas una respecto de la otra en un espacio tridimensional para
20 formar una superficie de unión al antígeno. La superficie de unión a antígeno es complementaria a la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y liviana se denominan "regiones determinantes de complementariedad" o
25 "CDR". La asignación de aminoácidos a cada dominio está de

acuerdo con las definiciones de Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1987 y 1991)), o Chothia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987), Chothia *et al.* *Nature* 342:878-883 (1989).

5 Como se usa en la presente, el término "epítopo" incluye cualquier determinante de proteína, capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina, un scFv o receptor de células T. El término "epítopo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unirse específicamente a
10 una inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes epitópicos usualmente consisten en agrupaciones de superficie químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y, por lo general, tienen características estructurales tridimensionales
15 específicas, así como características de carga específicas. Por ejemplo, se pueden generar anticuerpos contra péptidos N-terminales o C-terminales de un polipéptido. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es $\leq 1 \mu\text{M}$; con preferencia $\leq 100 \text{ nM}$
20 y con máxima preferencia $\leq 10 \text{ nM}$.

 Como se usa en la presente, los términos "unión específica", "unión inmunológica" y "propiedades de unión inmunológica" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se produce entre una molécula de inmunoglobulina
25 y un antígeno para el cual la inmunoglobulina es específica.

La fuerza o afinidad de las interacciones de unión inmunológica se puede expresar en términos de la constante de disociación (K_d) de la interacción, donde una K_d menor representa una afinidad mayor. Las propiedades de unión

5 inmunológica de polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar usando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de tales métodos implica medir las tasas de formación y disociación del complejo de sitio de unión al antígeno/antígeno, donde esas tasas dependen de las

10 concentraciones de los compañeros del complejo, la afinidad de la interacción y los parámetros geométricos que influyen igualmente en la tasa en ambas direcciones. Por lo tanto, tanto la "constante de la tasa de asociación" (k_{on}) como la "constante de la tasa de disociación" (k_{off}) se pueden

15 determinar mediante el cálculo de las concentraciones y las tasas reales de asociación y disociación. (Ver *Nature* 361:186-87 (1993)). La relación de k_{off}/k_{on} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación K_d . (Ver,

20 en general, Davies et al. (1990) *Annual Rev Biochem* 59:439-473). Se dice que un anticuerpo de la presente invención se une específicamente a CTLA-4, cuando la constante de unión en equilibrio (K_d) es $\leq 1 \mu M$, con preferencia $\leq 100 \text{ nM}$, con más preferencia $\leq 10 \text{ nM}$, y con máxima preferencia $\leq 100 \text{ nM}$ a

25 aproximadamente 1 pM , medido por ensayos tales como ensayos

de unión de radioligando o ensayos similares conocidos por los expertos en la técnica.

El término "polinucleótido aislado" como se usa en la presente se refiere a un polinucleótido de origen genómico, ADNc o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen, el "polinucleótido aislado" (1) no está asociado con todos o una porción de un polinucleótido en el que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está operativamente unido a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más grande. Los polinucleótidos de acuerdo con la invención incluyen las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada mostradas en la presente y las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de inmunoglobulina de cadena liviana mostradas en la presente.

El término "proteína aislada" al que se hace referencia en la presente significa una proteína de ADNc, ARN recombinante o de origen sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen, o fuente de derivación, la "proteína aislada" (1) no está asociada con proteínas encontradas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas murinas, (3) se expresa en una célula de una especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza .

El término "polipéptido" se usa en la presente como un término genérico para referirse a proteína nativa, fragmentos o análogos de una secuencia polipeptídica. Por lo tanto, los fragmentos proteicos nativos y los análogos son especies del género polipeptídico. Los polipéptidos de acuerdo con la invención comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada mostradas en la presente, y las moléculas de inmunoglobulina de cadena liviana mostradas en la presente, así como moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena liviana, tales como moléculas de inmunoglobulina de cadena liviana kappa, y viceversa, así como sus fragmentos y análogos.

El término "natural" tal como se usa en la presente aplicado a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (que incluyen virus) que se pueden aislar de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio o de otro modo es natural.

El término "unido operativamente", como se usa en la presente, se refiere a que las posiciones de los componentes que se describen están en una relación que les

permite funcionar de la manera prevista. Una secuencia de control "unida operativamente" a una secuencia de codificación se liga de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se consigue en condiciones
5 compatibles con las secuencias de control.

El término "secuencia de control", como se usa en la presente, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias de codificación a las que están ligadas. La
10 naturaleza de tales secuencias de control difiere de acuerdo con el organismo huésped en procariotas, tales secuencias de control incluyen generalmente promotor, sitio de unión ribosómico y secuencia de terminación de la transcripción en eucariotas, generalmente, tales secuencias de control
15 incluyen promotores y secuencia de terminación de la transcripción. El término "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es
20 ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias compañeras de fusión. El término "polinucleótido", como se denomina en la presente, significa nucleótidos de al menos 10 bases de longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El
25 término incluye formas de ADN de cadena simple o doble.

El término "oligonucleótido" al que se hace referencia en la presente incluye nucleótidos naturales y modificados unidos entre sí por uniones oligonucleotídicas naturales y no naturales. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que generalmente comprende una longitud de 200 bases o menos. Con preferencia, los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases y con máxima preferencia 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son usualmente de cadena simple, por ejemplo, para sondas, aunque los oligonucleótidos pueden ser de cadena doble, por ejemplo, para usar en la construcción de un gen mutante. Los oligonucleótidos de la invención son oligonucleótidos sentido o antisentido.

El término "nucleótidos naturales" al que se hace referencia en la presente incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" al que se hace referencia en la presente incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificados o sustituidos y similares. El término "uniones de oligonucleótidos" al que se hace referencia en la presente incluye uniones de oligonucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenioato, fosforodiselenioato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato, y similares. Ver por ejemplo, LaPlanche et al. *Nucl. Acids Res.* 14:9081 (1986); Stec et al. *J. Am. Chem. Soc.*

106:6077 (1984), Stein et al. *Nucl. Acids Res.* 16:3209 (1988),
 Zon et al. *Anti Cancer Drug Design* 6:539 (1991); Zon et al.
 Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-
 108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford
 5 England (1991)); Stec et al. *patente estadounidense* No.
 5.151.510; Uhlmann and Peyman *Chemical Reviews* 90:543 (1990).
 Un oligonucleótido puede incluir una marca para detección, si
 se desea.

Como se usa en la presente, los veinte aminoácidos
 10 convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional.
 Véase Immunology-A Synthesis (2^a Edición, E. S. Golub y D. R.
 Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland Mass. (1991)). Los
 estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte
 aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales
 15 como aminoácidos α , α -disustituidos, aminoácidos N-alquilo,
 ácido láctico y otros aminoácidos no convencionales también
 pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la
 presente invención. Los ejemplos de aminoácidos no
 convencionales incluyen: 4 hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato,
 20 ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilsina, O-fosfoserina, N-
 acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-
 hidroxilisina, σ -N-metilarginina y otros aminoácidos e
 iminoácidos similares (p. ej., 4-hidroxiprolina). En la
 notación de polipéptidos usada en en la presente, la
 25 dirección de la izquierda es la dirección del amino terminal

y la dirección de la derecha es la dirección del carboxi terminal, de acuerdo con el uso y la convención estándar.

Como se aplica a polipéptidos, el término "identidad sustancial" significa que dos secuencias peptídicas, cuando están óptimamente alineadas, tal como mediante los programas GAP o BESTFIT usando ponderaciones de brecha predeterminadas, comparten al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, con preferencia al menos 90 por ciento identidad de secuencia, con más preferencia al menos 95 por ciento de identidad de secuencia, y con máxima preferencia al menos 99 por ciento de identidad de secuencia.

Como se analiza en la presente, se contemplan variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina incluidas en la presente invención, siempre que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos el 75%, con más preferencia al menos el 80%, 90%, 95%, y con máxima preferencia 99% de identidad de secuencia. En particular, se contemplan reemplazos conservadores de aminoácidos. Los reemplazos conservadores son aquellos que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente generalmente se dividen en familias: (1) los aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) los aminoácidos básicos son lisina, arginina, histidina; (3) aminoácidos no polares

son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano, y (4) los aminoácidos polares no cargados son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Los aminoácidos

5 hidrofílicos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina y treonina. Los aminoácidos hidrofóbicos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos

10 incluyen (i) serina y treonina, que son la familia alifática-hidroxi; (ii) asparagina y glutamina, que son la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que son la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptófano y tirosina, que son la familia aromática. En el caso de un

15 anticuerpo, es razonable esperar que un reemplazo aislado de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o un reemplazo similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto importante sobre la unión o

20 las propiedades de la molécula resultante, especialmente si el reemplazo no implica un aminoácido dentro de una CDR o región estructural. Si un cambio de aminoácido produce un péptido funcional se puede determinar fácilmente mediante el ensayo de la actividad específica del derivado polipeptídico.

25 Los ensayos se describen en detalle en la presente. Los

expertos en la técnica pueden preparar fácilmente fragmentos o análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina. Los extremos terminales amino y carboxi preferidos de los fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de los dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales se pueden identificar mediante la comparación de los datos de la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos con las bases de datos de secuencias públicas o patentadas. Con preferencia, los métodos de comparación computados se usan para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de proteína predichos que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen métodos para identificar secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie *et al.* *Science* 253:164 (1991). Por lo tanto, los ejemplos anteriores demuestran que los expertos en la técnica pueden reconocer motivos de secuencia y conformaciones estructurales que se pueden usar para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con la invención.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis en regiones del anticuerpo activable distintas de las del ligador escindible que comprende el CM, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos proteicos, (4) alteran las

afinidades de unión, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de esos análogos. Los análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distinta de la secuencia peptídica natural. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos simples o múltiples (con preferencia sustituciones conservadoras de aminoácidos) en la secuencia natural (con preferencia en la porción del polipéptido fuera de los dominios que forman contactos intermoleculares). Una sustitución de aminoácidos conservadora no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia original (por ejemplo, un reemplazo de aminoácido no debe tender a romper una hélice que aparece en la secuencia original o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan a la secuencia original). Los ejemplos de estructuras secundarias y terciarias polipeptídicas reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); and Thornton *et al.* *Nature* 354:105 (1991).

El término "fragmento de polipéptido" como se usa en la presente se refiere a un polipéptido que tiene una supresión de amino terminal y/o carboxilo terminal y/o una o

más supresiones internas, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia natural deducida, por ejemplo, de una secuencia de ADNc de longitud completa. Los

5 fragmentos típicamente tienen al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud, con preferencia al menos 14 aminoácidos de longitud, con más preferencia al menos 20 aminoácidos de longitud, habitualmente al menos 50 aminoácidos de longitud, e incluso con más preferencia al

10 menos 70 aminoácidos de longitud. El término "análogo" como se usa en la presente se refiere a polipéptidos que comprenden un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene identidad sustancial con una porción de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene unión específica a CTLA-4,

15 en condiciones de unión adecuadas. Típicamente, los análogos polipeptídicos comprenden una sustitución conservadora de aminoácidos (o adición o supresión) con respecto a la secuencia natural. Los análogos típicamente tienen al menos 20 aminoácidos de longitud, con preferencia al menos 50

20 aminoácidos de longitud o más, y a menudo pueden ser tan largos como un polipéptido de longitud natural de longitud completa.

El término "agente" se usa en la presente para designar un compuesto químico, una mezcla de compuestos

25 químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de

materiales biológicos.

Como se usa en la presente, los términos "marca" o "marcado" se refieren a la incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante la incorporación de un aminoácido radiomarcado o una unión a un polipéptido de restos biotinilo que se pueden detectar mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar mediante métodos ópticos o calorimétricos). En ciertas situaciones, la etiqueta o marcador también puede ser terapéutica. Se conocen en la técnica diversos métodos para marcar polipéptidos y glicoproteínas y se pueden usar. Los ejemplos de marcas para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), marcas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforo lantánido), marcas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscentes, grupos biotinilo, epítomos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas de epítopo). En algunas modalidades, las marcas están unidas por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el potencial

impedimento estérico.

Otros términos de química de la presente invención se usan de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ejemplifica en The McGraw-Hill Dictionary of Chemical
5 Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Como se usa en la presente, "sustancialmente puro" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, sobre una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y con
10 preferencia una fracción sustancialmente purificada es una composición en donde la especie objeto comprende al menos aproximadamente 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición sustancialmente pura comprenderá más de
15 aproximadamente 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, con más preferencia más de aproximadamente 85%, 90%, 95% y 99%. Con máxima preferencia, la especie objeto se purifica a homogeneidad esencial (las especies contaminantes no se
20 pueden detectar en la composición mediante métodos de detección convencionales) en donde la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

Como se usa en la presente, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o
25 deseados. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados

pueden incluir, pero no se limita a, uno o más de: alivio de uno o más síntomas, disminución del grado de enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, no empeoramiento), prevención o retraso de la diseminación (por ejemplo, metástasis) de la enfermedad, prevenir o retrasar la aparición o recurrencia de la enfermedad, retrasar o lentificar la progresión de la enfermedad, mejorar el estado de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total). También abarca el "tratamiento" la reducción de las consecuencias patológicas de una enfermedad proliferativa como el cáncer. Los métodos proporcionados en la presente contemplan uno o más de estos aspectos del tratamiento.

El término "cantidad efectiva" usado en la presente se refiere a una cantidad de un compuesto o composición, cuando se usa solo o en combinación con una segunda terapia, es suficiente para tratar un trastorno, afección o enfermedad específica tal como mejorar, aliviar o disminuir y/o retrasar uno o más de sus síntomas. En referencia a cánceres u otra proliferación celular no deseada, una cantidad efectiva comprende una cantidad suficiente para causar que un tumor se reduzca y/o disminuya la tasa de crecimiento del tumor (tal como para suprimir el crecimiento tumoral) o para prevenir o retrasar otra proliferación celular no deseada. Se puede administrar una cantidad efectiva en una o más administraciones.

Como se usa en la presente, por "terapia de combinación" se entiende que se administra un primer agente junto con otro agente. "Conjuntamente con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento además de otra
5 modalidad de tratamiento. Como tal, "junto con" se refiere a la administración de una modalidad de tratamiento antes, durante o después de la administración de la otra modalidad de tratamiento para el individuo.

El término "agente farmacéutico o fármaco" como se
10 usa en la presente se refiere a un compuesto químico o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un sujeto.

Como se usa en la presente, por "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente compatible" se entiende un
15 material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, por ejemplo, el material se puede incorporar en una composición farmacéutica administrada a un individuo o sujeto sin causar efectos biológicos indeseables significativos o interactuar de manera perjudicial con cualquiera de los otros
20 componentes de la composición en la que está contenido. Los portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables han cumplido, por ejemplo, los estándares requeridos de pruebas toxicológicas y de fabricación y/o están incluidos en la Guía de ingredientes inactivos preparada por la Administración de
25 Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América

[U.S. Food and Drug administration].

Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, por ejemplo, melanoma, como melanoma no resecable o metastásico, leucemia, linfoma, blastoma, carcinoma y sarcoma. Los ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (LLA Ph+), carcinoma de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, glioma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, cáncer de riñón, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, neuroblastoma, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, carcinoma de colon y cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, tumor de células germinales, sarcoma pediátrico, citolítico sinonasal natural, mieloma múltiple, leucemia mielógena aguda (LMA) y leucemia linfocítica crónica (LMC).

"Leucemia" se refiere a enfermedades malignas progresivas de los órganos formadores de sangre y generalmente se caracteriza por una proliferación y

desarrollo distorsionados de leucocitos y sus precursores en la sangre y la médula ósea. La leucemia generalmente se clasifica clínicamente sobre la base de (1) la duración y el carácter de la enfermedad, aguda o crónica; (2) el tipo de

5 célula involucrada; mielóide (mielógena), linfoide (linfógena) o monocítica; y (3) el aumento o no aumento en el número de células anormales en la sangre: leucémico o aleucémico (subleucémico). La leucemia incluye, por ejemplo,

10 leucemia no linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia granulocítica aguda, leucemia granulocítica crónica, leucemia promielocítica aguda, leucemia de células T en adultos, leucemia aleucémica, una leucemia leucocítica, leucemia basófila, leucemia de células blásticas, leucemia bovina, leucemia mielocítica crónica, leucemia cutánea,

15 leucemia embrionaria, leucemia eosinofílica, leucemia de Gross, leucemia de células pilosas, leucemia hemoblástica, leucemia hemocitoblástica, leucemia histiocítica, leucemia de células madre, leucemia monocítica aguda, leucemia leucopénica, leucemia linfática, leucemia linfoblástica,

20 leucemia linfocítica, leucemia linfógena, leucemia linfoide, leucemia de células linfosarcoma, leucemia mastocítica, leucemia megacariocítica, leucemia micromieloblástica, leucemia monocítica, leucemia mieloblástica, leucemia mielocítica, leucemia granulocítica mielóide, leucemia

25 mielomonocítica, leucemia de Naegeli, leucemia de células

plasmáticas, leucemia plasmocítica, leucemia promielocítica, leucemia de células de Rieder, leucemia de Schilling, leucemia de células madre, leucemia subleucémica y leucemia celular indiferenciada. En ciertos aspectos, la presente
5 invención proporciona tratamiento para la leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda y/o la leucemia linfoblástica aguda positiva para el cromosoma Filadelfia (Ph + ALL) .

I. Anticuerpos anti-CTLA-4 activables

10 La presente invención proporciona anticuerpos anti-CTLA-4 mejorados que son tan eficaces como los anticuerpos anti-CTLA-4 tradicionales (por ejemplo, ipilimumab) pero con un perfil de seguridad mayor, es decir mejorado. Específicamente, los anticuerpos anti-CTLA-4 mejorados son
15 anticuerpos monoclonales activables (mAbs) que se unen específicamente a CTLA-4 humano cuando se activan. Estos anticuerpos anti-CTLA-4 mejorados, también mencionados en la presente como anticuerpos anti-CTLA-4 activables o anticuerpos CTLA-4 activables, se usan en métodos para tratar,
20 prevenir, retrasar la progresión de, mejorar y/o aliviar un síntoma de una enfermedad o trastorno, que incluye, pero sin limitación, una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad de CTLA-4 aberrante. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables se usan en métodos para
25 tratar, prevenir, retrasar la progresión de, mejorar y/o

aliviar un síntoma de un cáncer u otra afección neoplásica. Los anticuerpos activables se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses No. 8,513,390, 8,518,404; 9,120,853; 9,127,053 y Publicación Internacional No. WO 2016/149201.

5 En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables provistos en la presente comprenden (i) ipilimumab o su dominio de unión al antígeno (AB), tal como una cadena liviana variable de ipilimumab (VL), (ii) un resto escindible (CM), y (iii) un resto enmascarador (MM). En algunas
10 modalidades, el VL se acopla al MM, de modo que el acoplamiento del MM reduce la capacidad del ipilimumab de unirse a CTLA-4. En algunas modalidades, el MM se acopla al VL por medio de un resto escindible (CM) (también conocido como un ligador de sustrato) que incluye un sustrato para una
15 proteasa, por ejemplo, una proteasa que se sobreexpresa en el microambiente tumoral.

Anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno

En algunas modalidades, el anticuerpo o dominio de unión a antígeno del mismo (AB) comprende las regiones
20 determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo anti-CTLA-4 ipilimumab, identificado como 10D1 en las patentes estadounidenses No. 6,984,720 y 7,605,238, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. Ipilimumab (también conocido anteriormente como MDX-010 y BMS-734016) se
25 comercializa como YERVOY® y ha sido aprobado para el

tratamiento del melanoma metastásico y está en ensayos clínicos en otros cánceres. Ver Hoos *et al.* (2010) *Semin. Oncol.* 37:533; Hodi *et al.* (2010) *N. Engl. J. Med.* 363:711; Pardoll (2012) *Nat. Immunol.* 13(12): 1129.

- 5 Ipilimumab tiene un isotipo IgG1 humano, que se une mejor a la mayoría de los receptores Fc humanos (Bruhns *et al.* (2009) *Blood* 113: 3716) y se considera equivalente a IgG2a murino con respecto a los tipos de receptores Fc activadores a los que se une. Debido a que IgG1 se une al receptor
- 10 activador CD16 (FcγRIIIa) expresado por células NK humanas y monocitos, ipilimumab puede mediar la ADCC. El isotipo IgG1 ipilimumab se aisló originalmente en forma directa de un hibridoma, pero posteriormente se clonó y se expresó en células de ovario de hámster chino (CHO). A pesar de la
- 15 consideración de que un isotipo que media ADCC y/o CDC podría ser indeseable en un anticuerpo dirigido a un receptor en células T que busca regular por aumento una respuesta inmune, el isotipo IgG1 del anticuerpo se retuvo, en parte, porque mejoró la respuesta de la vacuna en mono cynomolgus y se
- 20 consideró funcional. Se ha demostrado que el ipilimumab aumenta el número de células T activadas en la sangre, como se evidencia, por ejemplo, por un aumento significativo en la expresión de HLA-DR en la superficie de células CD4+ y CD8+ postratamiento, así como aumentos en recuento de linfocitos
- 25 absoluto (Ku *et al.* (2010) *Cancer* 116:1767; Attia *et al.*

(2005) *J. Clin. Oncol.* 23:6043; Maker et al. (2005) *J. Immunol.* 175:7746; Berman et al. (2009) *J. Clin. Oncol.* 27(supl):15s.3020; Hamid et al. (2009) *J. Clin. Oncol.* 27(supl): 15s.9008), lo que indica que la reducción de

5 células T no produce en la periferia en el hombre. Ipilimumab demostró solo niveles moderados de ADCC de células T activadas usando PBMC activadas con IL-2 como células efectoras; sin embargo, el uso de T_{regs} como blancos no fue analizado. Se han observado cambios menores en la frecuencia

10 de T_{reg} periférica en la sangre de pacientes tratados con ipilimumab (Maker et al. (2005) *J. Immunol.* 175:7746), pero se dispone de poca información sobre el efecto del ipilimumab sobre las T_{reg} intratumorales. Sin embargo, se ha descrito una correlación positiva entre una relación alta de CD8⁺ a T_{reg} y

15 necrosis tumoral en biopsias de lesiones de melanoma metastásico de pacientes tratados con ipilimumab. Hodi et al. (2008) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 105:3005. Además, el tejido tumoral de pacientes con cáncer de vejiga tratados con ipilimumab tuvo porcentajes más bajos de células T CD4⁺ Foxp3⁺

20 que los tumores de pacientes con cáncer de vejiga no tratados. Liakou et al. (2008) *Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA)* 105:14987.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 activable comprende una combinación de una cadena pesada variable CDR1 (VH CDR1, también denominado en la presente

25 como CDRH1), CDR2 (VH CDR2, también denominado en la presente

como CDRH2), y CDR3 (VH CDR3, también denominado en la presente como CDRH3), y una cadena liviana variable CDR1 (VL CDR1, también denominado en la presente como CDRL1), CDR2 (VL CDR2, también denominado en la presente como CDRL2), y CDR3
 5 (VL CDR3, también denominado en la presente como CDRL3).
 Estas secuencias de CDR se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencias de CDR de cadenas pesadas y livianas para Ipilimumab

	CADENA	CDR1	CDR2	CDR3
	LIVIANA	RASQSVGSSYLA (SEQ ID NO: 560)	GAFSRAT (SEQ ID NO: 561)	QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 562)
10	PESADA	SYTMH (SEQ ID NO: 557)	FISYDGNNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 558)	TGWLGPFDY (SEQ ID NO: 559)

Ipilimumab-cadena VL

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPD
 RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:
 15 344)

Ipilimumab-cadena VH

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYA
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLTVTVSS
 (SEQ ID NO: 345)

20 Otras secuencias varias, como se indica, se proporcionan a continuación.

LC constante Kappa humana

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS
 KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:
 25 346)

Cadena liviana constante Kappa de ratón

RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDS
 KDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO:
 347)

5 LC Kappa humana - Ipilimumab

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPD
 RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLS
 KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 348)

10 LC kappa de ratón Ipilimumab

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPD
 RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFPPS
 SEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTTLT
 KDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO: 349)

15 HC constante de IgG1 humana

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
 RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKN
 20 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 350)

HC constante de IgG1 de ratón

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
 25 VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTY

RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
 QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
 FSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 351)

HC constante de IgG2a de ratón

5 AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDL
 YTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPS
 VFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTL
 RVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKK
 QVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNS
 10 YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 352)

Ipilimumab-VH- HC constante de IgG1 humana

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYA
 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLTVTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 15 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 353)

20 Ipilimumab-VH- HC constante de IgG1 de ratón

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYA
 DSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLTVTVSSASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
 SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
 25 PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
 VMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 354)

Ipilimumab-VH- HC constante de IgG2a de ratón

5 QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYA
 DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGLTVTVSSAKTT
 APSVYPLAPVCGD TTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLS
 SSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIF
 PPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVS
 10 ALPIQH QDWM SGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISK PKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTL
 TCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS
 VVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (SEQ ID NO: 355)

En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una
 combinación de una secuencia de CDR VH, una secuencia de CDR2
 15 VH, una secuencia de CDR3 VH, una secuencia de CDR1 VL, una
 secuencia de CDR2 VL, y una secuencia de CDR3 VL, donde al
 menos una secuencia de CDR comprende 1, 2, 3, 4 o más
 diferencias de secuencia de aminoácidos en comparación con
 las secuencias de CDR mostradas en la Tabla 2, que incluye
 20 diferencias de aminoácidos conservadoras.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4
 activable comprende un dominio variable de la cadena pesada
 que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,
 99% o más idéntico al grupo que consiste en la SEQ ID NO: 345.
 25 En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 activable

comprende un dominio variable de la cadena liviana, que no incluye ningún MM, CM, ligador, espaciador u otra secuencia añadida en la creación de la forma activable del anticuerpo, que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,
5 99% o más idéntico al grupo que consiste en la SEQ ID NOs: 563 a 565.

En algunas modalidades, el anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno que se une a CTLA-4 en los anticuerpos activables puede incluir modificaciones,
10 particularmente en la región Fc del anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno. Por ejemplo, la interacción de anticuerpos con FcγRs se puede potenciar mediante la modificación del resto de glicano unido a cada fragmento de Fc en el residuo de N297. En particular, la ausencia de
15 residuos de fucosa central potencia fuertemente la ADCC mediante la unión mejorada de IgG a la activación de FcγRIIIA sin alterar la unión al antígeno o CDC. Natsume *et al.* (2009) *Drug Des. Devel. Ther.* 3:7. Existe evidencia convincente de que los anticuerpos específicos de tumores afucosilados se
20 traducen en una actividad terapéutica mejorada en modelos de ratones *in vivo*. Nimmerjahn & Ravetch (2005) *Science* 310:1510; Mossner *et al.* (2010) *Blood* 115:4393.

La modificación de la glicosilación del anticuerpo se puede realizar, por ejemplo, mediante la expresión del
25 anticuerpo en una célula huésped con maquinaria de

glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y se pueden usar como células huésped en las que expresar anticuerpos recombinantes de esta descripción para producir

5 de ese modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705 y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (α -(1,6)-fucosiltransferasa) (ver la Publicación de solicitud de la patente estadounidense, No. 20040110704; Yamane-Ohnuki *et al.*

10 (2004) *Biotechnol. Bioeng.* 87: 614), de modo que los anticuerpos expresados en estas líneas celulares carecen de fucosa en sus carbohidratos. A modo de otro ejemplo, el documento EP 1176195 también describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente alterado así como líneas celulares

15 que tienen poca o ninguna actividad para añadir fucosa a la N-acetilglucosamina que se une a la región Fc del anticuerpo, por ejemplo, el línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La publicación PCT WO 03/035835 describe una variante de línea celular CHO, Lec13, con capacidad reducida

20 para unir fucosa a carbohidratos unidos a Asn (297), lo que da como resultado la hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula huésped. Ver también Shields *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733. Los anticuerpos con un perfil de glicosilación modificado también se pueden producir

25 en huevos de gallina, como se describe en la Publicación PCT

No. WO 2006/089231. Alternativamente, se pueden producir anticuerpos con un perfil de glicosilación modificado en células vegetales, tales como *Lemna*. Ver por ejemplo Publicación estadounidense No. 2012/0276086. La Publicación

5 PCT No. WO 99/54342 describe líneas celulares manipuladas genéticamente para expresar glicosiltransferasas que modifican glicoproteínas (por ejemplo, beta (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de manera que los anticuerpos expresados en las líneas celulares manipuladas

10 genéticamente exhiben aumento de estructuras de GlcNac de bisección que producen aumento de actividad ADCC de los anticuerpos. Ver también Umaña *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17: 176. Alternativamente, los restos de fucosa del anticuerpo se pueden escindir usando una enzima fucosidasa.

15 Por ejemplo, la enzima alfa-L-fucosidasa elimina los residuos de fucosilo de los anticuerpos. Tarentino *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516. La fucosilación central también se puede reducir mediante el cultivo de células productoras de anticuerpos en presencia de análogos de fucosa de molécula

20 pequeña, tales como los descritos en EP2282773B1, o en presencia de castanospermina, como se describe en WO 08/052030.

Resto escindible

En algunas modalidades, el CM es específico para

25 una proteasa, que es útil para potenciar la actividad de

proteasa desregulada en células tumorales para la activación de anticuerpos activables dirigidos en el sitio de tratamiento y/o diagnóstico. Numerosos estudios han demostrado la correlación de niveles de proteasa aberrantes, por ejemplo, uPA, legumina, MT-SPl, metaloproteasas de matriz (MMP), en tumores sólidos. (Ver por ejemplo, Murthy R V, et al. "Legumain expression in relation to clinicopathologic and biological variables in colorectal cancer." *Clin Cancer Res.* 11 (2005): 2293-2299; Nielsen B S, et al. "Urokinase plasminogen activator is localized in stromal cells in ductal breast cancer." *Lab Invest* 81 (2001): 1485-1501; Look O R, et al. "In situ localization of gelatinolytic activity in the extracellular matrix of metastases of colon cancer in rat liver using quenched fluorogenic DQ-gelatin." *J Histochem Cytochem.* 51 (2003): 821-829).

Una descripción general de este proceso se describe en las patentes estadounidenses No. 7,666,817, 8,513,390 y 9,120,853 y las Publicaciones Internacionales No. WO 2016/118629 y WO 2016/149201, que se incorporan en la presente por referencia en sus totalidades. El proceso de selección del resto escindible se usa para identificar restos escindibles que tienen varias características deseables. Por ejemplo, los restos escindibles seleccionados son sistémicamente estables (es decir, estables en la circulación sistémica de un sujeto), generalmente no son susceptibles de

escisión por proteasas circulantes tales como plasmina, trombina, activador tisular del plasminógeno (tPA) o una calicreína (KLK) tales como KLK-5 y/o KLK-7, no son tóxicos, generalmente no son susceptibles de escisión en sitios

5 potenciales de toxicidad tales como la piel por proteasas tales como ADAM 9, ADAM 10, ADAM 17 y/o calicreínas, tales como KLK-5 y KLK-7, y están activos en un sitio previsto de tratamiento y/o diagnóstico. En algunas modalidades, los restos escindibles identificados se seleccionan para

10 proteasas que están sobreexpresadas en un sitio previsto de terapia y/o diagnóstico, pero que típicamente no se expresan en o en un tejido normal, sano o no enfermo o no dañado, y luego los sustratos seleccionados posteriormente se analizan contra proteasas expresadas en tejido normal, por ejemplo, no

15 enfermo. Los ejemplos de proteasas y/o enzimas se proporcionan en la Tabla 1 como se indicó anteriormente.

En algunas modalidades, el resto escindible se selecciona del grupo que consiste en 2001 y 3001, y sus derivados. En algunas modalidades, el resto escindible se

20 selecciona del grupo que consiste en 2001 (SEQ ID NO: 297), 2006 (SEQ ID NO: 300), 2007 (SEQ ID NO: 301), 2008 (SEQ ID NO: 302), 2009 (SEQ ID NO: 303), 2012 (SEQ ID NO: 305), 2011 (SEQ ID NO: 304), 2003 (SEQ ID NO: 298), 3001 (SEQ ID NO: 306), 3006 (SEQ ID NO: 313), 3007 (SEQ ID NO: 308), 3008 (SEQ

25 ID NO: 309), 3009 (SEQ ID NO: 310), 3012 (SEQ ID NO: 312),

3011 (SEQ ID NO: 311), y 2005 (SEQ ID NO: 299). La Tabla 3 proporciona restos escindibles adicionales que se pueden usar con los anticuerpos CTLA-4 activables descritos en la presente.

5

Tabla 3. Restos escindibles activables anti-CTLA-4

10

15

20

25

IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	Secuencia de CM
313	LSGRSDNH
314	LSGRSANPRG
315	TGRGPSWV
316	PLTGRSGG
317	TARGPSFK
318	NTLSGRSENHSG
319	NTLSGRSGNHGS
320	TSTSGRSANPRG
321	TSGRSANP
322	VHMPLGFLGP
306	AVGLLAPPGGLSGRSDNH
307	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
308	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
309	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
310	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
338	AVGLLAPPGGLSGRSDYH
339	AVGLLAPPGGLSGRSANI
340	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
312	AVGLLAPPGGLSGRSANP
311	AVGLLAPPGGLSGRSDNP
299	AVGLLAPPSGRSANPRG
323	AVGLLAPP
324	AQNLLGMV
325	QNQALRMA
326	LAAPLGLL
327	STFPFGMF
328	ISSGLLSS
329	PAGLWLDP
330	VAGRSMRP
331	VVPEGRRS
332	ILPRSPAF
333	MVLGRSLL
334	VAGRSMRP
335	QGRAITFI
336	SPRSIMLA
337	SMLRSMPL

5

297	ISSGLLSGRSDNH
300	ISSGLLSGRSDDH
301	ISSGLLSGRSDIH
302	ISSGLLSGRSDQH
303	ISSGLLSGRSDTH
341	ISSGLLSGRSDYH
342	ISSGLLSGRSANI
343	ISSGLLSGRSDNI
305	ISSGLLSGRSANP
304	ISSGLLSGRSDNP
298	ISSGLLSGRSANPRG

Resto enmascarador

Los anticuerpos anti-CTLA-4 activables provistos en la presente comprenden un resto enmascarador (MM). En algunas modalidades, el MM es una secuencia de aminoácidos que se acopla, o une de otro modo, al anticuerpo anti-CTLA-4 y se ubica dentro del constructo del anticuerpo anti-CTLA-4 activable de modo que el MM reduce la capacidad del anticuerpo anti-CTLA-4 para unir específicamente CTLA-4. En algunas modalidades, el MM se une específicamente al dominio de unión al antígeno. Los MM adecuados se identifican usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, los péptidos MM se identifican usando los métodos descritos en las Publicaciones de la solicitud de patente de Estados Unidos de Améroca No. 2009/0062142 por Daugherty *et al.* y 2012/0244154 de Daugherty *et al.*, cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, el MM se selecciona del grupo que consiste en YV01 a YV66 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la siguiente Tabla 4.

Tabla 4: Restos enmascaradores anti-CTLA4 (MM)

	IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	SECUENCIA DE MM	IDENTIFICADOR DE SECUENCIA	SECUENCIA DE MM
5	1	DFSCLHSMYNVCLDP	147	EHCDVWMFGFNLCPY
	2	QPCAQMYGYSMCPHT	148	EPCDYWMFGVNLCPY
	3	LHCRTQMYGYNLCPY	149	EQCTMWMYGFNLCPY
	4	LHCRTQLYGYNLCPY	150	ESACSLRMYEVCLQP
	5	CTYSFFNVC	151	ESCASMYGYSMCPRT
10	6	CAQMYGYSMC	152	ESCSYWMFGYNLCPY
	7	CPNHPMC	153	FSNTCPHHPMCYDYR
	8	GTACTYSFFNVCLDP	154	FWNTCPHHPMCHDYK
	9	FGTACPNHPMCHDWQ	155	FYQNCYPPTWCMSFS
	10	SACAYWMFGVNLCPY	156	GECSYWMFGYNLCPY
	11	CRTQLYGYNLC	157	GGSCMYSFFNICLDP
	12	CRTQIYGYNLC	158	GGSCVYVMYNVCLDP
	13	LHCRTQIYGYNLCPY	159	GHCLMHMYGYNLCPK
	14	CPNHMPMCHDWQ	160	GHCRMSMYEMTLCPR
	15	GTACPNHPMCHDWQ	161	GISCVHIMFNFCLDP
15	16	CAYWMFGVNLCPY	162	GLCVMYMFGVNLCPY
	17	QECHLYMYGVNLCPY	163	GSCDYWMFGYNLCPY
	18	CHLYMYGVNLCPY	164	GSYCMYVMYNVCLDP
	19	GQCQFYMFGYNLCPY	165	GTKCIYSFYNVCLDP
	20	LSTCMYSFFNVCLDP	166	GTSTCPYHPMCHDYR
	21	CLHSMYNVCLDP	167	GTTCTYSFFNVCLDP
	22	CLHSMYNV	168	GVCHFFMYGVSMCPA
	23	CLHSLYNVCLDP	169	GVPCWYSMYNVCLDP
	24	CLHSAYNVCLDP	170	GVSCMYSMFNICLDP
	25	CMYSFFNVCLDP	171	HAKCVYSFFNVCLDP
20	26	CMYSFFNVC	172	HDSCMYSMYNFCLDP
	27	QPCAQMYGYSMC	173	HGNTCPNHMPMCHDYQ
	28	CAQLYGYSMCPHT	174	HKGCLYSFYNICLDP
	29	CAQMYGYSMCAHT	175	HKGCLYSFYNVCLDP
	30	CAQMYGYSMCPAT	176	HLSCMYIMYNVCLDP
	31	CAQMYGYSMCPHT	177	HSSCIYSMFNVCLDP
	32	CPNHPLCHDWQ	178	HTNMCPYHPMCYDYK
	33	CPNHMPMCHDWQ	179	HTPCTYSFFNVCLDP
	34	CPNHMPMCHAWQ	180	IMNTCPYHPMCHDYQ
	35	CPNHMPMCHDAQ	181	IVPCTYMMFGVCLQP
25	36	CPNHMPMCHDWA	182	KKCDYWIFYGVNLCPY
	37	GTACPNHPMC	183	KNTCVYSFFNVCLDP
	38	LHCRTQLYGYNLC	184	KPCAQMYGYSMCPHP
	39	CRTQLYGYNLCPY	185	KPSCMYSFFNVCLDP
	40	CRTQLYGYNLCAY	186	KRPCMYSFYNVCLDP
	41	CRTQLYGYNLCPA	187	KTSCMYSFYNICLDP
	42	FGTACPNHPLCHDWQ	188	KTTCTYSFFNVCLDP
	43	CPNHPLCHDFQ	189	LDCQMYWWFGACGDM
	44	CPNHPLCHDYQ	190	LHCAIYMYGYNLCPF
	45	CPNHPLCPY	191	LHCPFQMYGYNLCPH
25	46	CPNHPLCPA	192	LHCSMYMYGFNLCPN
	47	CMYSFFNVCYP	193	RECMAYMYGYNLCPY

5	48	CMYSFFNVCYA	194	RHCQMFMFGYDLCPY
	49	CLYSFFNVCYP	195	LIHCRYVMYGMCLCP
	50	CLYSFFNVCYA	196	LLPCEVMGSPSRCKHD
	51	FGAACPNHPICHDWQ	197	LPCHAYMYGYSLCPY
	52	FGAACPNHPLCHDWQ	198	LPCLAYMYGVNLCPN
10	53	FGAACPNHPMCHDAQ	199	LPCMAYMFGFNLCPH
	54	CLHSAYNACLDP	200	LPCNFHMFNFNLCPY
	55	CAHSAYNVCLDP	201	LQCAMYMYGVNLCPY
	56	CLHSAYNVCLADP	202	LSSCTYSFFNVCLDP
	57	CLHSAYNVCLAP	203	LTCPFQMYGVNLCPY
	58	CLHSAYNVCLDA	204	LTSQCSPWYWCQIYD
	59	KNTCTYVMYNVCLDP	205	LYCPYMMYGVNLCPY
	60	YISDCPYHPMCHDYQ	206	LYHCTYSFYNVCLDP
	61	FRNTCPYHPMCHDYR	207	LYRCIYSFYNVCLDP
	62	RECHMWMFGVNLCPY	208	MGCSMRMWGMELCPE
15	63	AVCHMYMYGVNLCPF	209	MKCDYWLYGVNLCPY
	64	RSCPQMYGYSMCPHT	210	MNHCTLHMYNICMDP
	65	QPCAQMFGYSMCPHT	211	MNPECPHHPMCHNSN
	66	TAKCTYSFFNVCLDP	212	MPACTYSFFNICLDP
	67	DFSCLYSMYNVCLDP	213	MPQCHVIMYNLCLDP
	68	DVSCMYMMYNFCLDP	214	MSTCTYSFFNVCLDP
	69	CPNHMC	215	MTCNYWFGVNLCPY
	70	CMYSFFNVCYP	216	MYCHQSMFGFRMCPD
	71	CMYSFFNVCPA	217	NACAQMYGYSMCPHT
	72	CTYSFFNVCYP	218	NDCDISMFDQSLCPY
	73	CTYSFFNVCPA	219	NFSCVYVMFNVCLDP
	74	GFPCMYSMFNVCLDP	220	NFTCALTMYEVCCLDP
	75	GLSCMYSMYGYCLDP	221	NLCHAFMFGFNLCPY
	76	IPCDYWMFGVNLCPY	222	NLNNCPHHPMCHDYQ
	77	QVCHAYMYGVNLCPY	223	NPPCMYSFFNICLDP
20	78	RMYCTYSFYNVCLDP	224	NSACTYSFFNVCLDP
	79	ALSCMYIMYNVCLDP	225	NVCTVSMFGVMLCPS
	80	DFSCMYVMFNVCLDP	226	PACATLMYSVPLCPA
	81	DFSCVYSMFNVCLDP	227	PAPCMYSFYNVCLDP
	82	DMNTCPNHPMCHDYR	228	PLCAEMYGYSMCPHN
	83	DMNTCPRHPMCHDYH	229	PQCHLYMYGVNLCPY
	84	DSRCMYVMYNVCLDP	230	PRPCMYSFYNVCLDP
	85	EHLCTYSFYNVCLDP	231	QHCPCFQMYGVNLCPY
	86	ELSCVYSMFNFCLDP	232	QHCQMFMFGYNLCPY
	87	FTNNCPYHPMCHDYH	233	QHSCMYSFFNVCLDP
25	88	GFSCYIMYDVCLDP	234	QKCHSYLYGVNLCPY
	89	GSSCMYSMYNVCLDP	235	QKCNMFMFGYNLCPY
	90	HFSCMYIMYNVCLDP	236	QMNDPCPNHPMCHDYH
	91	LHCGMWMFGVNLCPK	237	QPCAQMYGYSMCPAT
	92	LPCQMWMFGHNLCPH	238	QPCAQMYGYSMCPRT
	93	LPCTMYMYGVNLCPY	239	RECHFFFYGVNLCPY
	94	LTCHHWMFGVNLCPY	240	LNCGMFMYGVNLCPY
	95	NFSCMYSMFNVCLDP	241	RLCTSYMFGYNLCPQ
	96	NNHCMYSFFNICLDP	242	RLSCMYSMFNVCLDP
	97	NRSCMYIMYNVCLDP	243	RNCPFVMFGVNLCPY
	98	NSCTMFMFGVNLCPY	244	RNGCMYSFFNVCLDP

5

10

15

20

99	NTCELYMFGVNLCPY	245	RNGCVYSFFNVCLDP
100	QHCDMWMFGYNLCPY	246	RPCHLYMFGYNLCPD
101	QHCPMYMFGYNLCPF	247	RPCHSYMYGINLCPY
102	QVCHIQMYGFDLCPH	248	RSCDMIMFGFNLCPY
103	RACDYWMYGVNLCPY	249	RSCPMWFYGVNLCPY
104	RQCHMQMFGYDLCPF	250	RSTVCFYDFCGPWER
105	SGSCLYSFYNVCLDP	251	RTCHFYMFGYNLCPY
106	SNGCTYSFFNVCLDP	252	RTCSMVMMFGYNLCPY
107	STCAQMYGYSMCPH	253	SGKCTYSFFNVCLDP
108	SYKCLYSFYNVCLDP	254	SIVCDLYWEATCLRP
109	VLYCTYVMYNVCLDP	255	SLSCTYSFFNICLDP
110	VNCGMWMFGYNLCPK	256	SMNTCPYHPMCFDYK
111	YGSCLYSFYNICLDP	257	SQCWMWMYGYNLCPK
112	YPCAQMYGYSMCPHT	258	SSSCMYSFFNVCLDP
113	AACDLWMFGVNLCPY	259	STACTYSFYNVCLDP
114	AFCTLAPYNQACIAN	260	STCAQMYGYSMCPHT
115	AGSCLYSMYNVCLDP	261	STRCVYSFYNVCLDP
116	ALCENTMYGYHLCPW	262	TACGAWMFGVNLCPY
117	ALSCMYIMYGVCCLDP	263	TGACMYSFYNVCLDP
118	APVCDVLMFGFCMQP	264	TLSCMYSMYNVCLDP
119	AQVCSIMMYGTCLMP	265	TSCTVTMYQISMCPY
120	ASTCMYSFYNVCLDP	266	VGGCRHSFYNVCLDP
121	AVCEFWMFGFNLCPY	267	VHCQMYMYGYNLCPY
122	DANTCPNHPMCYDYH	268	VHNCMYSFFNVCLDP
123	DFSCIYIMFDVCLDP	269	VMCKLHMYGIPVCPK
124	DFSCMYVMYGFCLDP	270	VNFCNYSMYGICLLP
125	DFTCMYSMYNVCLDP	271	VNFCYACYCMSCVFS
126	DFTCTYSMYNVCLDP	272	VNQCTYSFFNVCLDP
127	DHYCTYIMYSICLDP	273	VPCPFHMFGYNLCPY
128	DICTNFMFGVNLCPY	274	VRCQMWMYGFNLCPH
129	DINTCPYHPMCHDYH	275	VRPCTYSFFNVCLDP
130	DKNTCPLHPMCHDYR	276	VSGCTYSFFNICLDP
131	DMNMCPNHPMCHDWH	277	YCSSWDTMTIPACNN
132	DMNSCPNHPMCHDYH	278	YDCDLSMFGIEMCPQ
133	DMNSCPNHPMCYDYR	279	YGNTCPFHPMCHDYK
134	DMNTCPNHPMCFDYR	280	YGYCMYSFFNVCLDP
135	DMNTCPNHPMCHDFQ	281	YHCTMHMFGYNLCPF
136	DMNTCPNHPMCHDYR	282	YMNTCPNHPMCFDYQ
137	DMNTCPNHPMCYDYH	283	YMNTCPYHPMCHDYL
138	DMNTCPNHPMCYDYK	284	YMNTCPYHPMCHDYR
139	DMSTCPNHPMCHDYM	285	YNNCTYSFFNVCLDP
140	DRNMCPYHPMCYDYR	286	YPGCQYSFFNVCLDP
141	DSCAFMMFGVNLCPY	287	YRSCTHIMYNVCLDP
142	DSCRSVFDMWVNCWN	288	YSFCDMLMYDVCLVP
143	DTPNCPHHPMCHNHM	289	YSIDCGLSWWCGGMT
144	DVSCLYVMYSVCLDP	290	YSTTCPYHPMCHDYH
145	DWCASMMFGYNLCPY	291	YVNTCPHHPMCHDYH
146	EFSCMYSMFNVCLDP	292	YVNTCPYHPMCHDYN

25

En algunas modalidades, la K_d del anticuerpo anti-CTLA-4 activable, que comprende un MM descrito en la presente, hacia el blanco es al menos 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 veces mayor de, o entre 5-10, 10-100, 10-200, 10-500, 5 10-1000 veces mayor que la K_d del AB no modificado con un MM o del AB original hacia el blanco.

En algunas modalidades, el MM no es un ligando natural del anticuerpo activable. En algunas modalidades, el MM no contiene homología o sustancialmente no homología con 10 ningún ligando natural del anticuerpo activable. En algunas modalidades, el MM no es más de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, o 80% idéntico a ningún ligando natural del anticuerpo activable. En algunas modalidades, el MM es no más que 50%, 25%, 20%, o 10% 15 idéntico a cualquier ligando natural del anticuerpo activable. En algunas modalidades, el MM es no más que 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%; 40%, 45%; 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% u 80% idéntico a CTLA-4 humano. En algunas modalidades, el MM es no más que 50%, 25%, 20%, o 10% idéntico a CTLA-4 humano.

20 Ejemplos de anticuerpos anti-CTLA-4 activables

Los anticuerpos particulares descritos en la presente son anticuerpos anti-CTLA-4 activables que comprenden cualquier combinación de los restos enmascaradores, restos escindibles, dominios variables de la cadena liviana 25 (VL) (o las correspondientes CDR), y dominios variables de la

cadena pesada (VH) (o las correspondientes CDR) provistas en las Tablas 2-6. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 activable comprende una cadena liviana que comprende YV01 (SEQ ID NO: 1) como el resto enmascarador, LSGRSDNH (SEQ ID NO: 313) como el resto escindible, y el dominio variable de la cadena liviana (VL) de ipilimumab (SEQ ID NO: 344). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 activable comprende una cadena liviana que comprende YV01 (SEQ ID NO: 1) como el resto enmascarador, ISSGLLSGRSDNH (2001) (SEQ ID NO: 297) como el resto escindible, y los CDRs del dominio variable de la cadena liviana (VL) de ipilimumab (SEQ ID NOs: 560, 561, y 562, respectivamente). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 activable comprende el dominio variable de la cadena pesada (VH) de ipilimumab (SEQ ID NO: 345) o solo las correspondientes CDR (SEQ ID NOs: 557, 558, y 559).

En algunas modalidades, el anti-CTLA-4 activable comprende YV39 (SEQ ID NO: 39) como el resto enmascarador, y ISSGLLSGRSDNP ("2011") (SEQ ID NO: 304) como el resto escindible, y los dominios variables de la cadena pesada y cadena liviana de ipilimumab ((SEQ ID NOs: 345 y 344, respectivamente), donde los MM y CM se ligan al VL en la disposición MM-CM-VL.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 activable incluye un péptido señal. El péptido señal se puede

ligar al anticuerpo anti-CTLA-4 activable por un espaciador. En algunas modalidades, el espaciador se conjuga al anticuerpo activable en ausencia de un péptido señal. En algunas modalidades, el espaciador se une directamente al MM del anticuerpo activable. En algunas modalidades, el espaciador tiene la secuencia de aminoácidos QGQSGS (SEQ ID NO: 546). En algunas modalidades, un anticuerpo activable comprende un espaciador de la secuencia QGQSGS (SEQ ID NO: 546) unida directamente a una secuencia de MM CRTQLYGYNLCPY (YV39) (SEQ ID NO: 39) en la disposición estructural desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal del "espaciador-MM-CM-VL" o "espaciador-MM-CM-AB."

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 activable comprende un péptido ligador (LP) entre el MM y el CM. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 activable comprende un péptido ligador entre el CM y el anticuerpo o su dominio de unión al antígeno (AB). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 activable comprende un primer péptido ligador (LP1) y un segundo péptido ligador (LP2), y donde el anticuerpo anti-CTLA-4 activable tiene la disposición estructural desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de la siguiente manera: MM-LP1-CM-LP2-AB. En algunas modalidades, la cadena liviana del anticuerpo anti-CTLA-4 activable tiene la disposición estructural desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal de la siguiente

manera: MM-LP1-CM-LP2-VL. En algunas modalidades, los dos péptidos ligadores no deben ser idénticos entre sí. Los ejemplos de los péptidos ligadores que se pueden usar con los anticuerpos anti-CTLA-4 activables descritos en la presente se proporcionan en la Publicación de la patente estadounidense No. 2016/0193332 y Publicación internacional No. WO 2016/149201, *ibid*.

La descripción también comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 modificado que comprende un MM que se une a la cadena liviana del anticuerpo por medio de un ligador escindible no proteasa. En algunas modalidades, el ligador escindible no proteasa comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 570. En algunas modalidades, tal anticuerpo anti-CTLA-4 modificado tiene una cadena liviana que comprende YV39 y un ligador escindible no proteasa. En algunas modalidades, la cadena liviana del anticuerpo anti-CTLA-4 modificado comprende la secuencia de aminoácidos:

QGQSGSCRTQLYGYNLCPYGGGSSGGSGGSGGGSGGGSGGSEIVL
 TQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA
 FSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFG
 QGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACE
 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 530) o
 CRTQLYGYNLCPYGGGSSGGSGGSGGGSGGGSGGSEIVLTQSPGT
 LSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATG

IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVE
 IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA
 LQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
 SSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 531).

- 5 Los ligadores adecuados para usar en las composiciones descritas en la presente son generalmente los que proporcionan flexibilidad del anticuerpo anti-CTLA-4 activable para facilitar la inhibición de la unión del anticuerpo activable al blanco. Tales ligadores generalmente
- 10 se denominan ligadores flexibles (también denominados péptidos ligadores en la presente). Los ligadores adecuados se pueden seleccionar fácilmente y pueden ser de cualquiera de diferentes longitudes, tal como de 1 aminoácido (por ejemplo, Gly) a 20 aminoácidos,, de 2 aminoácidos a 15
- 15 aminoácidos, de 3 aminoácidos a 12 aminoácidos, que incluyen 4 aminoácidos a 10 aminoácidos, 5 aminoácidos a 9 aminoácidos, 6 aminoácidos a 8 aminoácidos, o 7 aminoácidos a 8 aminoácidos, y puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 aminoácidos de longitud.
- 20 Los ejemplos de ligadores flexibles incluyen polímeros de glicina (G) n, polímeros de glicina-serina (que incluyen, por ejemplo, (GS)n, (GSGGS)n (GSGGS es SEQ ID N°: 534) y (GGGS)n (GGGS es SEQ ID N°: 535), donde n es un número entero de al menos uno), polímeros de glicina-alanina,
- 25 polímeros de alanina-serina y otros ligadores flexibles

conocidos en la técnica. Los polímeros de glicina y glicina-serina están relativamente no estructurados y, por lo tanto, pueden servir como ligadura neutra entre los componentes. La glicina accede significativamente a más espacio phi-psi que
5 incluso la alanina, y está mucho menos restringida que los residuos con cadenas laterales más largas Scheraga, *Rev. Computational Chem.* 11173-142 (1992)). Los ejemplos de ligadores flexibles incluyen, pero sin limitación Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 536), Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (SEQ ID NO:
10 537), Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 538), Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 539), Gly- Gly-Gly-Ser-Gly (SEQ ID NO: 540), Gly-Ser-Ser-Ser-Gly (SEQ ID NO: 541), y similares. El profesional experto en la técnica reconocerá que el diseño de anticuerpos activables puede incluir ligadores que son total
15 o parcialmente flexibles, de manera que el ligador puede incluir un ligador flexible así como una o más porciones que confieren una estructura menos flexible para proporcionar una estructura de anticuerpos activables deseada.

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CTLA-4
20 activables comprende los VL y VH (o las correspondientes CDR) de ipilimumab y una combinación de MM y CM provistos en la siguiente Tabla 5 de modo que cualquier MM de la columna 2 se puede combinar con cualquier CM de la columna 4.

Tabla 5. Combinaciones de anticuerpo anti-CTLA-4 activables

	SEQ ID NO.	Resto enmascarador (MM)	SEQ ID NO.	Resto escindible (CM)
5	1	(YV01) DFSC LHSMY NVCLDP	313	LSGRSDNH
	2	(YV02) QPCAQMYGYSMCPHT	314	LSGRSANPRG
	3	(YV03) LHCRTQMYGYNLCPY	315	TGRGPSWV
	4	(YV04) LHCRTQLYGYNLCPY	316	PLTGRSGG
	5	(YV05) CTYSFFNVC	317	TARGPSFK
10	6	(YV06) CAQMYGYSMC	318	NTLSGRSENHSG
	7	(YV07) CPNHPMC	319	NTLSGRSGNHGS
	8	(YV08) GTACTYSFFNVCLDP	320	TSTSGRSANPRG
	9	(YV09) FGTACPNHPMCHDWQ	321	TSGRSANP
	10	(YV10) SACAYWMFGVNLCPY	322	VHMPLGFLGP
	11	(YV11) CRTQLYGYNLC	323	AVGLLAPP
	12	(YV12) CRTQIYGYNLC	324	AQNLLGMV
	13	(YV13) LHCRTQIYGYNLCPY	325	QNQALRMA
	14	(YV14) CPNHPMCHDWQ	326	LAAPLGLL
	15	(YV15) GTACPNHPMCHDWQ	327	STFPFGMF
15	16	(YV16) CAYWMFGVNLCPY	328	ISSGLLSS
	17	(YV17) QECHLYMYGVNLCPY	329	PAGLWLDP
	18	(YV18) CHLYMYGVNLCPY	330	VAGRSMRP
	19	(YV19) GQCQFYMFVNLCPY	331	VVPEGRRS
	20	(YV20) LSTCMYSFFNVCLDP	332	ILPRSPAF
	21	(YV21) CLHSMY NVCLDP	333	MVLGRSLL
	22	(YV22) CLHSMY NVC	334	VAGRSMRP
	23	(YV23) CLHSLY NVCLDP	335	QGRAITFI
	24	(YV24) CLHSAY NVCLDP	336	SPRSIMLA
	25	(YV25) CMYSFFNVCLDP	337	SMLRSMPL
20	26	(YV26) CMYSFFNVC	297	ISSGLLSGRSDNH
	27	(YV27) QPCAQMYGYSMC	300	ISSGLLSGRSDDH
	28	(YV28) CAQLYGYSMCPHT	301	ISSGLLSGRSDIH
	29	(YV29) CAQMYGYSMCAHT	302	ISSGLLSGRSDQH
	30	(YV30) CAQMYGYSMCPAT	303	ISSGLLSGRSDTH
	31	(YV31) CAQMYGYSMCPHT	341	ISSGLLSGRSDYH
	32	(YV32) CPNHPLCHDWQ	342	ISSGLLSGRSANI
	33	(YV33) CPNHPMCADWQ	343	ISSGLLSGRSDNI
	35	(YV34) CPNHPMCHAWQ	305	ISSGLLSGRSANP
	35	(YV35) CPNHPMCHDAQ	304	ISSGLLSGRSDNP
25	36	(YV36) CPNHPMCHDWA	298	ISSGLLSGRSANPRG
	37	(YV37) GTACPNHPMC	306	AVGLLAPPGGLSGRSDNH
	38	(YV38) LHCRTQLYGYNLC	307	AVGLLAPPGGLSGRSDDH
	39	(YV39) CRTQLYGYNLCPY	308	AVGLLAPPGGLSGRSDIH
	40	(YV40) CRTQLYGYNLCPY	309	AVGLLAPPGGLSGRSDQH
	41	(YV41) CRTQLYGYNLCPA	310	AVGLLAPPGGLSGRSDTH
	42	(YV42) FGTACPNHPLCHDWQ	338	AVGLLAPPGGLSGRSDYH
	43	(YV43) CPNHPLCHDFQ	339	AVGLLAPPGGLSGRSANI
	44	(YV44) CPNHPLCHDYQ	340	AVGLLAPPGGLSGRSDNI
	45	(YV45) CPNHPLCPY	312	AVGLLAPPGGLSGRSANP
	46	(YV46) CPNHPLCPA	311	AVGLLAPPGGLSGRSDNP

5	47	(YV47) CMYSFFNVCYP	299	AVGLLAPPSGRSANPRG
	48	(YV48) CMYSFFNVCYA		
	49	(YV49) CLYSFFNVCYP		
	50	(YV50) CLYSFFNVCYA		
	51	(YV51) FGAACPNHPICHDWQ		
	52	(YV52) FGAACPNHPLCHDWQ		
	53	(YV53) FGAACPNHPMCHDAQ		
	54	(YV54) CLHSAYNACLDP		
	55	(YV55) CAHSAYNVCLDP		
	56	(YV56) CLHSAYNVCLADP		
	57	(YV57) CLHSAYNVCLAP		
	58	(YV58) CLHSAYNVCLDA		
	59	(YV60) KNTCTYVMYNVCLDP		
	60	(YV61) YISDCPYHPMCHDYQ		
	61	(YV62) FRNTCPYHPMCHDYR		
	62	(YV63) RECHMWMFGVNLCYP		
	63	(YV64) AVCHMYMYGYNLCPF		
	64	(YV65) RSCPQMYGYSMCPHT		
	65	(YV66) QPCAQMFGYSMCPHT		

10 En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables comprenden la combinación específica de MM y CM provistos en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6. Ejemplo de combinaciones de anticuerpo anti-CTLA-4 activables

15	Comb. No.	Resto enmascarador (MM)	Resto escindible (CM)
	1	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	2	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 304)
	3	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 305)
	4	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 302)
	5	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 300)
	6	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 303)
	7	LHCRTQMYGYNLCPY (SEQ ID NO: 3)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	8	LHCRTQMYGYNLCPY (SEQ ID NO: 3)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	9	LHCRTQMYGYNLCPY (SEQ ID NO: 3)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 300)
20	10	LHCRTQMYGYNLCPY (SEQ ID NO: 3)	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 301)
25			

5	11	LHCRTQMYGYNLCPY (SEQ ID NO: 3)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 302)
	12	LHCRTQMYGYNLCPY (SEQ ID NO: 3)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 303)
	13	CAQMYGYSMC (SEQ ID NO: 06)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	14	CAQMYGYSMC (SEQ ID NO: 06)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	15	FGTACPNHPMCHDWQ (SEQ ID NO: 09)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
10	16	FGTACPNHPMCHDWQ (SEQ ID NO: 09)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	17	CLHSLYNVCLDP (SEQ ID NO: 23)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	18	CLHSLYNVCLDP (SEQ ID NO: 23)	ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 300)
	19	CLHSLYNVCLDP (SEQ ID NO: 23)	ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 301)
	20	CLHSLYNVCLDP (SEQ ID NO: 23)	ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 302)
15	21	CLHSLYNVCLDP (SEQ ID NO: 23)	ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 303)
	22	CLHSLYNVCLDP (SEQ ID NO: 23)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	23	CLHSAYNVCLDP (SEQ ID NO: 24)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	24	CLHSAYNVCLDP (SEQ ID NO: 24)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	25	QPCAQMYGYSMC (SEQ ID NO: 27)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
20	26	QPCAQMYGYSMC (SEQ ID NO: 27)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	27	CAQMYGYSMCAHT (SEQ ID NO: 29)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	28	CAQMYGYSMCAHT (SEQ ID NO: 29)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	29	CPNHPLCHDWQ (SEQ ID NO: 32)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	30	CPNHPLCHDWQ (SEQ ID NO: 32)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
25	31	CPNHPMCADWQ (SEQ ID NO: 33)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	32	CPNHPMCADWQ (SEQ ID NO: 33)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	33	CPNHPMCHDAQ (SEQ ID NO: 35)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	34	CPNHPMCHDAQ (SEQ ID NO: 35)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)

5	35	CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	36	CRTQLYGYNLCPA (SEQ ID NO: 41)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	37	CRTQLYGYNLCPA (SEQ ID NO: 41)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	38	FGAACPNHPICHDWQ (SEQ ID NO: 51)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	39	FGAACPNHPICHDWQ (SEQ ID NO: 51)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
10	40	FGAACPNHPLCHDWQ (SEQ ID NO: 52)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	41	FGAACPNHPLCHDWQ (SEQ ID NO: 52)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	42	FGAACPNHPMCHDAQ (SEQ ID NO: 53)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	43	FGAACPNHPMCHDAQ (SEQ ID NO: 53)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	44	CLHSAYNACLDP (SEQ ID NO: 54)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
15	45	CLHSAYNACLDP (SEQ ID NO: 54)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	46	CAHSAYNVCLDP (SEQ ID NO: 55)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	47	CAHSAYNVCLDP (SEQ ID NO: 55)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	48	CLHSAYNVCADP (SEQ ID NO: 56)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	49	CLHSAYNVCADP (SEQ ID NO: 56)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
20	50	CLHSAYNVCLAP (SEQ ID NO: 57)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	51	CLHSAYNVCLAP (SEQ ID NO: 57)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	52	CLHSAYNVCLDA (SEQ ID NO: 58)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	53	CLHSAYNVCLDA (SEQ ID NO: 58)	AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306)
	54	YISDCPYHPMCHDYQ (SEQ ID NO: 60)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
25	55	FRNTCPYHPMCHDYR (SEQ ID NO: 61)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	56	AVCHMYMYGYNLCPF (SEQ ID NO: 63)	ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297)
	57	RSCPQMYGYSMCPHT (SEQ ID NO: 64)	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 305)
	58	QPCAQMFGYSMCPHT (SEQ ID NO: 65)	ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 305)

En algunas modalidades, los anticuerpos anti-CTLA-4 activables descritos en la presente también incluyen un agente conjugado al anticuerpo activable. En algunas modalidades, el agente conjugado es un agente terapéutico, tal como un agente anti-neoplásico. En algunas modalidades, el agente se conjuga a un resto carbohidrato del anticuerpo activable, con preferencia donde el resto carbohidrato se ubica fuera de la región de unión al antígeno del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno en el anticuerpo activable.

10 En algunas modalidades, el agente se conjuga a un grupo sulfhidrilo del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno en el anticuerpo activable. En algunas modalidades, el agente se conjuga a un grupo amino del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del anticuerpo activable. En algunas

15 modalidades, el agente se conjuga a un grupo ácido carboxílico del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del anticuerpo activable.

En algunas modalidades, el agente es un agente citotóxico tal como una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal

20 o animal, o fragmentos de estas), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

En algunas modalidades, el anticuerpo activable conjugado se puede modificar para la conjugación específica

25 de sitio a través de secuencias de aminoácidos modificadas

insertadas o incluidas de otro modo en la secuencia de anticuerpo activable. Estas secuencias de aminoácidos modificadas se diseñan para permitir la colocación controlada y/o la dosificación del agente conjugado dentro de un anticuerpo anti-CTLA-4 activable conjugado. Por ejemplo, el anticuerpo activable se puede manipular genéticamente para incluir sustituciones de cisteína en posiciones de las cadenas liviana y pesada que proporcionan grupos tiol reactivos y no afectan negativamente al plegamiento y ensamblaje de proteínas, ni alteran la unión al antígeno. En algunas modalidades, el anticuerpo activable se puede manipular genéticamente para incluir o introducir de otro modo uno o más residuos de aminoácidos no naturales dentro del anticuerpo activable para proporcionar sitios adecuados para la conjugación. En algunas modalidades, el anticuerpo activable se puede manipular genéticamente para incluir o introducir de otra manera secuencias de péptidos activables enzimáticamente dentro de la secuencia de anticuerpo activable.

En algunas modalidades, el agente es un resto detectable tal como, por ejemplo, una marca u otro marcador. Por ejemplo, el agente es o incluye un aminoácido radiomarcado, uno o más restos biotinilo que se pueden detectar mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o

actividad enzimática que se puede detectar mediante métodos ópticos o calorimétricos), uno o más radioisótopos o radionucleidos, uno o más marcadores fluorescentes, uno o más marcadores enzimáticos y/o uno o más agentes quimioluminiscentes. En algunas modalidades, los restos detectables se unen mediante moléculas ligadoras.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos tales (como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoyl)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, *Science* 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético marcado con carbono-14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. (Ver WO94/11026).

Los expertos en la técnica reconocerán que se puede

acoplar una gran variedad de restos posibles a los anticuerpos resultantes de la invención. (Ver, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse y R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, Nueva York, (1989), cuyos contenidos completos se incorporan en la presente por referencia).

II. Usos de anticuerpos anti-CTLA-4 activables

Las formulaciones terapéuticas de la invención, que incluyen un anticuerpo anti-CTLA-4 activable, se usan para prevenir, tratar o mejorar de otro modo una enfermedad o trastorno, que incluye, pero sin limitación, una enfermedad o trastorno asociado con. expresión y/o actividad de CTLA-4 aberrante. Por ejemplo, las formulaciones terapéuticas de la invención, que incluyen un anticuerpo anti-CTLA-4 activable, se usan como inmunoterapia para el cáncer, por ejemplo, potenciando una respuesta inmune endógena en un sujeto afectado con cáncer para tratar así al sujeto, tal método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los anticuerpos anti-CTLA-4 activables descritos en la presente.

Los ejemplos de cánceres que se pueden tratar usando los métodos inmunoterapéuticos de la descripción incluyen cáncer de hueso, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma maligno cutáneo o intraocular, melanoma no resecable

o metastásico, cáncer renal, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de testículo, cáncer de útero, carcinoma de trompas de Falopio, carcinoma

5 de endometrio, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de

10 la uretra, cáncer de pene, neoplasia maligna hematológica, tumores sólidos de la infancia, linfoma linfocítico, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de la pelvis renal, neoplasma del sistema nervioso central (SNC), linfoma primario del SNC, angiogénesis tumoral, tumor del eje espinal,

15 glioma del tronco encefálico, adenoma pituitario, sarcoma de Kaposi, cáncer epidermoide, cáncer de células escamosas, cánceres inducidos por el medio ambiente, incluidos los inducidos por el asbesto, cánceres metastásicos y cualquier combinación de esos cánceres. En algunas modalidades, el

20 cáncer se selecciona de MEL, RCC, NSCLC escamoso, NSCLC no escamoso, CRC, CRPC, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, y carcinomas de esófago, ovario, tracto gastrointestinal y mama. Los presentes métodos también son aplicables al tratamiento de cánceres metastásicos.

25 Otros cánceres incluyen neoplasias malignas

hematológicas que incluyen, por ejemplo, mieloma múltiple, linfoma de células B, linfoma de Hodgkin/linfoma de células B de mediastino primario, linfomas no Hodgkin, linfoma mieloide agudo, leucemia mielógena crónica, leucemia linfoide crónica, 5 linfoma folicular, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Burkitt, linfoma de células grandes inmunoblásticas, linfoma linfoblástico de precursores B, linfoma de células del manto, leucemia linfoblástica aguda, micosis fungoide, linfoma anaplásico de células grandes, 10 linfoma de células T y linfoma linfoblástico de precursores T, y cualquier combinación de esos cánceres.

Se sabe que el aumento de la proteólisis es una característica distintiva del cáncer. (Ver por ejemplo, Affara N I, et al. "Delineating proteasa functions during 15 cancer development." *Methods Mol Biol.* 539 (2009): 1-32). La progresión, invasión y metástasis de los tumores provienen de varios procesos interdependientes en los que están implicadas las proteasas. Este proceso se describe generalmente en la Publicación estadounidense No. 2016/0193332 A1, que se 20 incorpora en su totalidad.

En algunas modalidades de estos métodos para tratar a un sujeto con cáncer, los anticuerpos activables de la presente invención, por ejemplo, ipilimumab activable, se administra al sujeto como monoterapia. En algunas modalidades, 25 la estimulación o bloqueo de blancos inmunomoduladores se

puede combinar efectivamente con tratamientos de cáncer estándar, que incluyen regímenes de quimioterapia, radiación, cirugía, deprivación de hormonas e inhibidores de angiogénesis. El anticuerpo anti-CTLA-4 activable se puede
5 unir a un agente antineoplásico (como un inmunoconjugado) o se puede administrar por separado del agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo se puede administrar antes, después o al mismo tiempo que el agente o se puede coadministrar con otros agentes terapéuticos
10 conocidos. Los fármacos quimioterapéuticos incluyen, entre otros, doxorubicina (ADRIAMYCIN[®]), cisplatino, carboplatino, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo (LEUKERAN[®]), ciclofosfamida (CYTOXAN[®]; NEOSAR[®]), lenalidomida (REVLIMID[®]), bortezomib (VELCADE[®]), dexametasona, mitoxantrona, etopósido,
15 citarabina, bendamustina (TREANDA[®]), rituximab (RITUXAN[®]), ifosfamida, vincristina (ONCOVIN[®]), fludarabina (FLUDARA[®]), talidomida (THALOMID[®]), alemtuzumab (CAMPATH[®], ofatumumab (ARZERRA[®]), everolimus (AFINITOR[®], ZORTRESS[®]) y carfilzomib (KYPROLISTM). La coadministración de agentes anticancerígenos
20 que operan a través de diferentes mecanismos puede ayudar a superar el desarrollo de resistencia a los fármacos o cambios en la antigenicidad de las células tumorales.

Los anticuerpos anti-CTLA-4 activables de la presente invención, tales como el ipilimumab activable,
25 también se pueden usar en combinación con otros agentes

inmunomoduladores, tales como anticuerpos contra otros
 receptores inmunomoduladores o sus ligandos. Se han
 identificado varios otros receptores coestimuladores e
 inhibidores y ligandos que regulan las respuestas de las
 5 células T. Los ejemplos de receptores estimuladores incluyen
 el coestimulador de células T inducible (ICOS), CD137 (4-
 1BB), CD134 (OX40), CD27, proteína relacionada con TNFR
 inducida por glucocorticoides (GITR) y mediador de entrada
 del virus del herpes (HVEM), mientras que los ejemplos de
 10 receptores inhibidores incluyen Muerte programada 1 (PD-1),
 Ligando 1 de muerte programada (PD-L1), atenuador de
 linfocitos B y T (BTLA), dominio 3 de inmunoglobulina y
 mucina de células T (TIM-3), Gen 3 de activación de
 linfocitos (LAG-3), receptor de adenosina A2a (A2aR),
 15 receptor G1 tipo lectina de células citolíticas (KLRG-1),
 receptor 2B4 de células citolíticas naturales (CD244), CD160,
 inmunorreceptor de células T con dominios de Ig y ITIM
 (TIGIT), y el receptor para el supresor de Ig dominio V de
 la activación de células T (VISTA). Mellman et al. (2011)
 20 *Nature* 480:480; Pardoll (2012) *Nat. Rev. Cancer* 12: 252;
 Baitsch et al. (2012) *PloS One* 7:e30852.

Los anticuerpos anti-PD-1 OPDIVO® (nivolumab) y
 KEYTRUDA® (pembrolizumab), así como el anticuerpo anti-PD-L1
 TECENTRIQ® (atezolizumab), han sido aprobados para su uso en
 25 el tratamiento del cáncer y se pueden combinar con los

anticuerpos anti-CLTA-4 activables de la presente invención, por ejemplo ipilimumab activable. Estos receptores y sus ligandos proporcionan blancos para agentes terapéuticos diseñados para estimular, o prevenir la supresión, de una
5 respuesta inmune para atacar de este modo las células tumorales. Weber (2010) *Semin. Oncol.* 37:430; Flies *et al.* (2011) *Yale J. Biol. Med.* 84:409; Mellman *et al.* (2011) *Nature* 480:480; Pardoll (2012) *Nat. Rev. Cancer* 12:252. A los receptores estimuladores o ligandos de receptores se
10 dirigen los agentes agonistas, mientras que los receptores inhibidores o ligandos de receptores son el blanco de agentes bloqueantes. Entre los enfoques más prometedores para potenciar la actividad antitumoral inmunoterapéutica está el bloqueo de los denominados "puntos de control
15 inmunológico", que se refieren a la gran cantidad de vías de señalización inhibitoras que regulan el sistema inmunológico y son cruciales para mantener la auto tolerancia y modular la duración y la amplitud de las respuestas inmunológicas fisiológicas en los tejidos periféricos con el fin de
20 minimizar el daño tisular colateral. Ver por ejemplo Weber (2010) *Semin. Oncol.* 37:430; Pardoll (2012) *Nat. Rev. Cancer* 12:252. Debido a que muchos de los puntos de control inmunológico se inician por interacciones ligando-receptor, se pueden bloquear fácilmente mediante anticuerpos o modular
25 mediante formas recombinantes de ligandos o receptores.

Anticuerpos anti-PD-1 útiles para la invención

Cualquier anticuerpo anti-PD-1 que se conoce en la técnica se puede usar en los métodos descritos en la presente. En particular, diversos anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a PD-1 con alta afinidad se han descrito en la patente de los Estados Unidos de América No. 8,008,449. Se ha demostrado que cada uno de los anticuerpos anti-PD-1 humanizados descritos en la Patente de los Estados Unidos de América No. 8,008,449 presenta una o más de las siguientes características: (a) se une a PD-1 humano con una K_D de 1×10^{-7} M o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial usando un sistema biosensor Biacore; (b) no se une sustancialmente a CD28, CTLA-4 o ICOS humano; (c) aumenta la proliferación de células T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR); (d) aumenta la producción de interferón- γ en un ensayo de MLR; (e) aumenta la secreción de IL-2 en un ensayo de MLR; (f) se une al PD-1 humano y PD-1 de mono cynomolgus; (g) inhibe la unión de PD-L1 y/o PD-L2 a PD-1; (h) estimula respuestas de memoria específicas de antígeno; (i) estimula las respuestas de anticuerpos; e (j) inhibe el crecimiento de células tumorales *in vivo*. Los anticuerpos anti-PD-1 utilizables en la presente invención incluyen los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a PD-1 humana y exhiben al menos una, en algunas modalidades, al menos cinco, de las características

precedentes.

Otros anticuerpos anti-PD-1 monoclonales se han descrito en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de América NO. 6,808,710, 7,488,802, 8,168,757 y 8,354,509, 5 Publicación de los Estados Unidos de América NO. 2016/0272708 y Publicación PCT NO. WO 2012/145493, WO 2008/156712, WO 2015/112900, WO 2012/145493, WO 2015/112800, WO 2014/206107, WO 2015/35606, WO 2015/085847, WO 2014/179664, WO 2017/020291, WO 2017/020858, WO 2016/197367, WO 2017/024515, WO 10 2017/025051, WO 2017/123557, WO 2016/106159, WO 2014/194302, WO 2017/040790, WO 2017/133540, WO 2017/132827, WO 2017/024465, WO 2017/025016, WO 2017/106061, cada uno de los cuales que se incorpora por referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 se 15 selecciona del grupo que consiste en nivolumab (también conocido como "OPDIVO®"; anteriormente designado 5C4, BMS-936558, MDX-1106, u ONO-4538), pembrolizumab (Merck, también conocido como "KEYTRUDA®", lambrolizumab, y MK-3475. Ver WO2008156712A1), PDR001 (Novartis; ver WO 2015/112900), MEDI- 20 0680 (AstraZeneca; AMP-514; ver WO 2012/145493), REGN-2810 (Regeneron; ver WO 2015/112800), JS001 (TAIZHOU JUNSHI PHARMA; ver Si-Yang Liu et al., *J. Hematol. Oncol.* 10:136 (2017)), BGB-A317 (Beigene; ver WO 2015/35606 y US 2015/0079109), INCSHR1210 (SHR-1210; Jiangsu Hengrui 25 Medicine; ver WO 2015/085847; Si-Yang Liu et al., *J. Hematol.*

Oncol. 10:136 (2017)), TSR-042 (ANB011; Tesaro Biopharmaceutical; ver WO2014/179664), GLS-010 (WBP3055; Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals; ver Si-Yang Liu *et al.*, *J. Hematol. Oncol.* 10:136 (2017)), AM-0001 (Armo), STI-1110
 5 (Sorrento Therapeutics; ver WO 2014/194302), AGEN2034 (Agenus; ver WO 2017/040790), y MGD013 (Macrogenics).

En una modalidad, el anticuerpo anti-PD-1 es nivolumab. Nivolumab es un anticuerpo inhibidor del punto de control inmune PD-1 IgG4 completamente humana (S228P) que
 10 impide selectivamente la interacción con los ligandos PD-1 (PD-L1 y PD-L2), de este modo bloquea la regulación por disminución de las funciones de las células T antitumorales (Patente de los Estados Unidos de América No. 8,008,449; Wang *et al.*, 2014 *Cancer Immunol Res.* 2(9):846-56).

15 En otra modalidad, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab. Pembrolizumab es un anticuerpo IgG4 monoclonal humanizado dirigido contra el receptor PD-1 de superficie celular humano (muerte programada 1 o muerte celular programada 1). Pembrolizumab se describe, por ejemplo, en las
 20 Patentes de los Estados Unidos de América No. 8,354,509 y 8,900,587; ver también www.cancer.gov/drugdictionary?cdrid=695789 (último acceso: 14 de diciembre de 2014). Pembrolizumab ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma recidivante y
 25 refractario.

Los anticuerpos anti-PD-1 utilizables en los métodos descritos también incluyen anticuerpos aislados que se unen específicamente a PD-1 humano y compiten de forma cruzada por la unión a PD-1 humano con cualquier anticuerpo anti-PD-1 descrito en la presente, por ejemplo, nivolumab (ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de América No. 8,008,449 y 8,779,105; WO 2013/173223). En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 se une al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 descritos en la presente, por ejemplo, nivolumab. La capacidad de los anticuerpos para competir de forma cruzada por la unión a un antígeno indica que estos anticuerpos monoclonales se unen a la misma región de epítipo del antígeno e impiden estéricamente la unión de otros anticuerpos que compiten en forma cruzada a esa región de epítipo particular. Se espera que estos anticuerpos de competencia cruzada tengan propiedades funcionales muy similares a las del anticuerpo de referencia, por ejemplo, nivolumab, en virtud de su unión a la misma región del epítipo de PD-1. Los anticuerpos que compiten de forma cruzada se pueden identificar fácilmente en función de su capacidad para competir de forma cruzada con nivolumab en ensayos de unión a PD-1 estándar tales como análisis Biacore, ensayos ELISA o citometría de flujo (ver, por ejemplo, WO 2013/173223).

En ciertas modalidades, los anticuerpos que

compiten de forma cruzada por la unión a PD-1 humana con, o se unen a la misma región del epítipo del anticuerpo anti-PD-1 humano, nivolumab, son anticuerpos monoclonales. Para la administración a sujetos humanos, estos anticuerpos que

5 compiten en forma cruzada son anticuerpos quiméricos, anticuerpos manipulados genéticamente o anticuerpos humanizados o humanos. Tales anticuerpos quiméricos, manipulados genéticamente, humanizados o humanos se pueden preparar y aislar por métodos bien conocidos en la técnica.

10 Los anticuerpos anti-PD-1 utilizables en los métodos de la invención descritos también incluyen porciones de unión al antígeno de los anticuerpos anteriores. Se ha demostrado ampliamente que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un

15 anticuerpo de longitud completa.

Los anticuerpos anti-PD-1 adecuados para usar en los métodos o composiciones descritos son anticuerpos que se unen a PD-1 con alta especificidad y afinidad, bloquean la unión de PD-L1 y/o PD-L2 e inhiben el efecto inmunosupresor

20 de la vía de señalización PD-1. En cualquiera de las composiciones o métodos descritos en la presente, un "anticuerpo" anti-PD-1 incluye una porción o fragmento de unión al antígeno que se une al receptor PD-1 y exhibe propiedades funcionales similares a las de los anticuerpos

25 completos en la inhibición de la unión al ligando y la

regulación por aumento del sistema inmunológico. En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-PD-1 o su porción de unión al antígeno compite de forma cruzada con nivolumab para unirse a PD-1 humano.

5 Anticuerpos anti-PD-L1 útiles para la invención

Cualquier anticuerpo anti-PD-L1 se puede usar en los métodos de la presente descripción. Los ejemplos de anticuerpos anti-PD-L1 útiles en los métodos de la presente descripción incluyen los anticuerpos descritos en la Patente
10 de los Estados Unidos de América No. 9,580,507. Se ha demostrado que cada uno de los anticuerpos anti-PD-L1 monoclonales humanos descritos en la Patente de los Estados Unidos de América No. 9,580,507 presenta una o más de las siguientes características: (a) se une a PD-L1 humano con una
15 K_D de 1×10^{-7} M o menos, según se determina por resonancia de plasmón superficial usando un sistema biosensor Biacore; (b) aumenta la proliferación de células T en un ensayo de reacción de linfocitos mixtos (MLR); (c) aumenta la producción de interferón- γ en un ensayo de MLR; (d) aumenta
20 la secreción de IL-2 en un ensayo de MLR; (e) estimula las respuestas de anticuerpo y (f) revierte el efecto de las células T reguladoras sobre las células T efectoras y/o células dendríticas. Los anticuerpos anti-PD-L1 utilizables en la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales
25 que se unen específicamente a PD-L1 humano y presentan al

menos una, en algunas modalidades, al menos cinco, de las características precedentes.

En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en BMS-936559 (anteriormente 12A4 o MDX-1105; ver, por ejemplo, Patente de los Estados Unidos de América No. 7,943,743 y WO 2013/173223), MPDL3280A (también conocido como RG7446, atezolizumab, and TECENTRIQ®; US 8,217,149; ver, también, Herbst et al. (2013) *J Clin Oncol* 31(suppl):3000), durvalumab (IMFINZI™; MEDI-4736; AstraZeneca; ver WO 2011/066389), avelumab (Pfizer; MSB-0010718C; BAVENCIO®; ver WO 2013/079174), STI-1014 (Sorrento; ver WO2013/181634), CX-072 (CytomX; ver WO2016/149201), KN035 (3D Med/Alphamab; ver Zhang et al., *Cell Discov.* 7:3 (marzo de 2017), LY3300054 (Eli Lilly Co.; ver, por ejemplo, WO 2017/034916), y CK-301 (Checkpoint Therapeutics; ver Gorelik et al., AACR:Abstract 4606 (abril 2016)).

En ciertas modalidades, el anticuerpo PD-L1 es atezolizumab (TECENTRIQ®). Atezolizumab es un anticuerpo anti-PD-L1 monoclonal IgG1 completamente humanizado.

En ciertas modalidades, el anticuerpo PD-L1 es durvalumab (IMFINZI™). Durvalumab es un anticuerpo anti-PD-L1 monoclonal kappa IgG1 humano.

En ciertas modalidades, el anticuerpo PD-L1 es avelumab (BAVENCIO®). Avelumab es un anticuerpo anti-PD-L1

monoclonal lambda IgG1 humano.

En otras modalidades, el anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 se selecciona del grupo que consiste en 28-8, 28-1, 28-12, 29-8, 5H1, y cualquiera de sus combinaciones.

5 Los anticuerpos anti-PD-L1 utilizables en los métodos descritos también incluyen anticuerpos aislados que se unen específicamente a PD-L1 humano y compiten de forma cruzada por la unión a PD-L1 humano con cualquier anticuerpo anti-PD-L1 descrito en la presente, por ejemplo, atezolizumab
10 y/o avelumab. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-PD-L1 se une al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos anti-PD-L1 descritos en la presente, por ejemplo, atezolizumab y/o avelumab. La capacidad de los anticuerpos para competir de forma cruzada por la unión a un antígeno
15 indica que estos anticuerpos se unen a la misma región de epítipo del antígeno e impiden estéricamente la unión de otros anticuerpos que compiten en forma cruzada a esa región de epítipo particular. Se espera que estos anticuerpos de competencia cruzada tengan propiedades funcionales muy
20 similares a las del anticuerpo de referencia, por ejemplo, atezolizumab y/o avelumab, en virtud de su unión a la misma región del epítipo de PD-L1. Los anticuerpos que compiten de forma cruzada se pueden identificar fácilmente en función de su capacidad para competir de forma cruzada con atezolizumab
25 y/o avelumab en ensayos de unión a PD-L1 estándar tales como

análisis Biacore, ensayos ELISA o citometría de flujo (ver, por ejemplo, WO 2013/173223).

En ciertas modalidades, los anticuerpos que compiten de forma cruzada por la unión a PD-L1 humana con, o
5 se unen a la misma región del epítipo del anticuerpo PD-L1 humano, atezolizumab y/o avelumab, son anticuerpos monoclonales. Para la administración a sujetos humanos, estos anticuerpos que compiten en forma cruzada son anticuerpos quiméricos, anticuerpos manipulados genéticamente o
10 anticuerpos humanizados o humanos. Tales anticuerpos monoclonales quiméricos, manipulados genéticamente, humanizados o humanos se pueden preparar y aislar por métodos bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos anti-PD-L1 utilizables en los
15 métodos de la invención descritos también incluyen porciones de unión al antígeno de los anticuerpos anteriores. Se ha demostrado ampliamente que la función de unión al antígeno de un anticuerpo se puede realizar mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa.

20 Los anticuerpos anti-PD-L1 adecuados para usar en los métodos o composiciones descritos son anticuerpos que se unen a PD-L1 con alta especificidad y afinidad, bloquean la unión de PD-1 e inhiben el efecto inmunosupresor. de la vía de señalización PD-1. En cualquiera de las composiciones o
25 métodos descritos en la presente, un "anticuerpo" anti-PD-L1

incluye una porción o fragmento de unión al antígeno que se une al PD-L1 y exhibe propiedades funcionales similares a las de los anticuerpos completos en la inhibición de la unión al receptor y la regulación por aumento del sistema inmunológico.

- 5 En ciertas modalidades, el anticuerpo anti-PD-L1 o su porción de unión al antígeno compite de forma cruzada con atezolizumab y/o avelumab para unirse a PD-L1 humano.

- La eficacia de la prevención, mejora o tratamiento se determina en asociación con cualquier método conocido para
- 10 diagnosticar o tratar la enfermedad o trastorno, que incluye, pero sin limitación, una enfermedad o trastorno asociado con expresión y/o actividad de CTLA-4 aberrante. La prolongación de la supervivencia de un sujeto o retrasar de otro modo la progresión de la enfermedad o trastorno, que incluye, pero
- 15 sin limitación a, una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad de CTLA-4 aberrante en un sujeto, indica que el anticuerpo activable confiere un beneficio clínico.

- Se apreciará que las entidades terapéuticas de
- 20 acuerdo con la invención se administrarán con portadores, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan en formulaciones para proporcionar una transferencia, suministro, tolerancia y similares mejorados. Se puede encontrar una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario
- 25 conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's

Pharmaceutical Sciences (15^a edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1975)), particularmente el Capítulo 87 por Blaug, Seymour, en el mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, ungüentos, jaleas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tales como Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidra, emulsiones aceite en agua y agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, con la condición de que el ingrediente activo en la formulación no sea inactivado por la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Ver también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." *Regul. Toxicol Pharmacol.* 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." *Int. J. Pharm.* 203(1-2):1-60 (2000), Charman W N "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." *J Pharm Sci.* 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" *PDA J Pharm Sci Technol.* 52:238-311 (1998) y las citas del mismo para información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y portadores bien

conocidos por los químicos farmacéuticos.

Los anticuerpos anti-CTLA-4 activables se pueden administrar en la forma de composiciones farmacéuticas. Se proporcionan los principios y consideraciones involucrados en la preparación de tales composiciones, así como la orientación en la elección de los componentes, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, and Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; y Peptide and Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, Nueva York.

La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, con preferencia aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico o agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito deseado.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas

de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (para
 5 ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

Las formulaciones para usar en la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

10 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, estas matrices están en forma de artículos conformados, por
 15 ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente Estados Unidos de América No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ
 20 etil-L-glutamato, etileno- acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras
 25 que los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y

ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

En algunas modalidades, el anticuerpo activable
5 contiene una marca detectable. Se puede usar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab, scFv, o F(ab)2). El término "marcado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende abarcar la marcación directa de la sonda o anticuerpo por acoplamiento (es decir, mediante la unión
10 física) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como la marcación indirecta de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Los ejemplos de marcación indirecta incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario
15 marcado fluorescentemente y la marcación final de una sonda de ADN con biotina de manera que se pueda detectar con estreptavidina marcada fluorescentemente. El término "muestra biológica" se considera que incluye tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos,
20 células y fluidos presentes en un sujeto. Se incluyen dentro del uso del término "muestra biológica", por lo tanto, la sangre y una fracción o componente de la sangre que incluye suero sanguíneo, plasma sanguíneo o linfa. Por ejemplo, el anticuerpo se puede marcar con un marcador radioactivo cuya
25 presencia y ubicación en un sujeto se pueden detectar

mediante técnicas de imagen estándares.

III. Composiciones farmacéuticas

Los anticuerpos anti-CTLA-4 activables de la invención (también denominado en la presente como "compuestos
5 activos"), y sus derivados, fragmentos, análogos y homólogos, se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Tales composiciones típicamente comprenden el anticuerpo activable y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en este documento,
10 el término "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica.

15 Los portadores adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en el campo, que se incorpora en la presente como referencia. Los ejemplos preferidos de tales portadores o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua,
20 solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa y albúmina sérica humana 5%. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida
25 en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible

con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su ruta de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solvantes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas descartables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso

inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una jeringabilidad fácil. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de estos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol,

sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede realizar incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

5 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. En
10 general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones
15 inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada en condiciones estériles.

20 Para la administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de una pulverización en aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

25 La administración sistémica también puede ser por

medios transmucosales o transdérmicos. Para la administración transmucosal o transdérmica, se usan penetrantes apropiados para la barrera a penetrar en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, pomadas, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

Los anticuerpos activables de la presente invención también se pueden administrar por vía subcutánea junto con agentes para facilitar la inyección de grandes volúmenes en un sitio único (agentes de dispersión de fármacos intersticiales) tales como glicoproteínas de hialuronidasa activas neutras solubles (SHASEGP), por ejemplo, glicoproteínas de hialuronidasa de PH-20 solubles humanas, tales como rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Ciertos ejemplos y métodos de uso de SHASEGP, que incluyen rHuPH20, se describen en las publicaciones de patente US NO. 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, un SHASEGP se combina con una o más glicosaminoglicanasas adicionales tales como condroitinasas.

Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios

convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

En algunas modalidades, los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto contra la
5 eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tal como etilenvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno,
10 poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que
15 incluyen liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales contra antígenos virales) también se pueden usar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en
20 la patente Estados Unidos de América No. 4,522,811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosis para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosis como se usa en la presente se
25 refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis

unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La memoria descriptiva para las formas de unidad de dosis de la invención está dictada y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico particular que se debe lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica de composición de ese compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración.

Las modalidades de la presente descripción se pueden definir adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que describen en detalle la preparación de ciertos anticuerpos de la presente descripción y métodos para usar anticuerpos de la presente descripción. Será evidente para los expertos en la materia que se pueden llevar a cabo muchas modificaciones, tanto en los materiales como en los métodos, sin apartarse del alcance de la presente descripción.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

Identificación de restos enmascaradores para el anticuerpo
anti-CTLA-4 activable

5 Para identificar los restos enmascaradores (MM) que
reducen la unión de anticuerpos anti-CTLA-4 a su proteína
blanco, se utilizó anticuerpo anti-CTLA-4 (es decir,
ipilimumab) para analizar bibliotecas de péptidos usando
métodos similares a los descritos en las Publicaciones
10 Internacionales PCT No. WO 2009/025846, WO 2010/081173, y WO
2016/149201, cuyos contenidos se incorporan en la presente
como referencia en su totalidad. El análisis consistió en dos
rondas de purificación por clasificación de células activadas
magnéticamente (MACS) seguida de tres rondas de clasificación
15 de células activadas por fluorescencia (FACS).

La purificación inicial de MACS se realizó con
proteína A Dynabeads® (Invitrogen) y anticuerpo anti-CTLA-4 a
una concentración de 100 nM. Aproximadamente 10^{11} células se
analizaron por la unión, y se recogieron 6×10^6 células. La
20 segunda purificación de MACS se realizó con estreptavidina
DYNABEADS® (Thermo Fisher Scientific) y anticuerpo anti-CTLA-
4 biotinilado a una concentración de 100 nM. El eluato de la
purificación MACS inicial se expandió, se analizaron
aproximadamente 1011 células para la unión, y se recolectaron
25 aproximadamente 107 células. El producto de purificación MACS

descrita anteriormente se sometió a rondas seriadas de clasificación FACS con concentraciones decrecientes de anti-CTLA-4 marcadas con Alexa Fluor® 488 (Thermo Fisher Scientific). El anticuerpo anti-CTLA4 marcado se usó a

5 concentraciones de 10 nM, 1 nM y 200 pM para la primera, segunda y tercera clases, respectivamente. Los clones peptídicos individuales, de la tercera clase se identificaron por análisis de secuencia y posteriormente se verificaron por su capacidad de unirse al anticuerpo anti-CTLA4. Se

10 seleccionaron dos secuencias consenso de péptidos para la maduración de afinidad: XXCXXXMYGYNLCPY (SEQ ID NO: 554) y XXXCXHSMYNVCLDP (SEQ ID NO: 555).

Las bibliotecas de maduración de afinidad se construyeron sobre estas secuencias consenso como se describe

15 en la Tabla 7. Las filas 1 y 3 representan la secuencia consenso y las filas 2 y 4 representan las secuencias de nucleótidos que codifican las bibliotecas peptídicas que se insertaron en el sistema de visualización usando un método similar a lo descrito en el número de publicación

20 internacional PCT WO 2010/081173, *ibid*.

Tabla 7: Bibliotecas de maduración

1	X	X	C	X	X	X	M	Y	G	Y	N	L	C	P	Y
2	NNK	NNK	TGC	NNK	NNK	NNK	NTT	TWT	GGG	KWT	AAT	CTG	TGC	CCG	TAT
3	X	X	X	C	X	H	S	M	Y	N	V	C	L	D	P
4	NNK	NNK	NNK	TGC	NNK	NWT	AGT	NTT	TWT	AAT	NTT	TGC	CTT	GAT	CCT

25 Las bibliotecas de maduración se analizaron de una

manera similar a la descrita para las bibliotecas naïve descritas anteriormente. El análisis consistió en una ronda de MACS y rondas subsiguientes de clasificación de FACS. La MACS se realizó con proteína A DYNABEADS® (Thermo Fisher Scientific) y el anticuerpo anti-CTLA-4 a una concentración de 100 nM. Para MACS, 1011 células se analizaron por unión, y se seleccionaron aproximadamente 10^8 células. El eluato del MACS se expandió, y aproximadamente 10^{11} células se sometieron a rondas seriadas de clasificación FACS con concentraciones decrecientes de anticuerpo anti-CTLA4 marcado con Alexa Fluor® 488. El anticuerpo anti-CTLA4 marcado se usó a concentraciones de 100 nM, 20 nM, 5 nM, 1 nM y 1 nM para la primera, segunda, tercera, cuarta y quinta clases, respectivamente. Los clones peptídicos individuales de las clases cuarta y quinta se identificaron por análisis de secuencia y posteriormente se verificaron por su capacidad de unirse al anticuerpo anti-CTLA4. Las secuencias de los restos enmascaradores anti-CTLA-4 identificados a través de los métodos descritos anteriormente se proporcionan en las Tablas 4 y 5. Cuatro secuencias consenso se pueden derivar de las secuencias de máscara enumeradas en las Tablas 4 y 5:

Consenso 1.

C(L/M/V/T)Y(S/V/I)(F/L/M/A)(Y/F)N(V/I)CLDP (SEQ ID NO: 566)

Consenso 2. CAQMYGYSMC(P/A)(H/R/A)T (SEQ ID NO:

25 567)

Consenso

3.

CX(M/I/Y/L/N/F) (Y/W/F/Q/T) (M/Y) YG(Y/V/F) (N/D) LCP(Y/F) (SEQ ID NO: 568)

Consenso

4.

5 (N/T) (S/T/M/A) CP(N/Y) HP(M/L) C(H/F/Y) D(Y/F/W) (SEQ ID NO: 569)

Ejemplo 2:

Construcción y caracterización de anticuerpos anti-muCTLA-4 activables

Para mostrar una prueba de concepto de que los
10 anticuerpos anti-CTLA-4 activables se pueden usar para tratar
tumores, se construyeron seis anticuerpos anti-CTLA-4 de
ratón activables (basados en el clon 9D9) usando técnicas
similares a las descritas en los Ejemplos 1 y 3 de la
presente. Estos anticuerpos comprenden MY11 o MY03 como el
15 resto enmascarador, y el resto escindible "0003" que tiene la
secuencia de aminoácidos TSTSGRSANPRG (SEQ ID NO: 320),
"1004" que tiene la secuencia de aminoácidos AVGLLAPP (SEQ ID
NO: 323), o "2001" que tiene la secuencia de aminoácidos
ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297). Los anticuerpos eran todos
20 isotipo de IgG2a de ratón. Como controles, se usaron
anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4 de ratón (9D9) ("9D9 mg2a")
y un anticuerpo toxina anti-diftéria humana con un isotipo
mIgG2a ("mg2a").

En el día 0, ratones BALB/c se inyectaron por vía
25 subcutánea con 1×10^6 células tumorales CT26. La

administración de diferentes anticuerpos comenzó el día 7 después de la implantación del tumor. Antes de la administración, se midió el tamaño del tumor y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en diferentes grupos de tratamiento, para tener los volúmenes tumorales medio comparables (por ejemplo, 39-44 mm³). Los tumores se midieron con calibradores bidimensionales, y el volumen tumoral se calculó como $L \times (W^2/2)$, L = longitud (la más larga de las 2 mediciones), W = ancho. Los ratones luego se trataron por vía intraperitoneal (i.p.) con el anticuerpo designado (por ejemplo, 25 µg/dosis). El volumen del tumor se midió dos veces por semana. En el día 12 después de la implantación del tumor, se sacrificaron algunos de los ratones de cada grupo, y se recolectaron el tumor y el bazo para el inmunomonitorio a fin de investigar los efectos de los anticuerpos en las poblaciones de células T. Algunos o todos los ratones restantes de los diferentes grupos se usaron para el posterior análisis farmacocinético (PK) y/o farmacodinámico (PD).

Como se muestra en la FIG. 1A, los ratones que recibieron el anticuerpo IgG2a de ratón no relacionado (es decir, el anticuerpo anti-toxina humana diftérica) no lograron controlar el tumor. Por el contrario, como se muestra en la FIG. 1C, los ratones que recibieron el anticuerpo anti-CTLA-4 activable de ratón (que comprende MY11

como el resto enmascarador y 2001 como el resto escindible) controlaron el tamaño del tumor casi tan bien como aquellos ratones que recibieron el mAb anti-CTLA-4 de ratón (9D9) (FIG. 1B). Estos datos demuestran que la proteasa específica de tumor puede escindir el resto escindible, lo que produce la eliminación del resto enmascarador y la unión del anticuerpo liberado a su proteína blanco.

Para determinar si los anticuerpos de anti-CTLA-4 de ratón activables son o no activos en la periferia, se determinaron la proliferación y la actividad de las células T reguladoras Foxp3+ en el bazo, y se determinó la abundancia de células T reguladoras en muestras tumorales para comparación, como se describe en el Ejemplo 5 a continuación. De acuerdo con los datos de las FIGs. 1B y 1C, todos los anticuerpos anti-CTLA-4 activables se comportaron de manera similar al mAb anti-CTLA-4 de ratón (9D9) en el tumor (FIG. 2A). En contraste, los anticuerpos activables se parecían al anticuerpo IgG2a de ratón no relacionado en el bazo (FIGs. 2B y 2C). Tales datos sugieren que el prodominio que contiene el resto enmascarador de los anticuerpos anti-CTLA-4 de ratón activables permanece intacto y se une al anticuerpo en el bazo, lo que bloquea la actividad del anticuerpo, mientras que el prodominio se escinde mediante proteasas específicas de tumor para generar anticuerpo anti-CTLA-4 completamente activo en el tumor.

Ejemplo 3:

Construcción de anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables

Se produjeron anticuerpos anti-CTLA4 activables que comprenden un resto enmascarador anti-CTLA4, un resto
5 escindible, y un anticuerpo anti-CTLA4 (por ejemplo, ipilimumab) de la descripción de acuerdo con métodos similares a los descritos en las Publicaciones PCT No. WO 2009/025846 *ibid.*, WO 2010/081173 *ibid.* y WO 2016/118629, *ibid.* Los anticuerpos anti-CTLA4 activables se expresaron en
10 células EXPI293™ (Thermo Fisher Scientific) y se purificaron mediante cromatografía de proteína A (MabSelect SuRe, GE Healthcare) de acuerdo con los protocolos de los fabricantes. El control de calidad de los anticuerpos activables resultantes indicó que la mayoría comprende al menos 95% de
15 monómero.

Para evaluar la viabilidad de usar los anticuerpos anti-CTLA-4 activables descritos en la presente en un escenario humano, los anticuerpos se produjeron como formato de cadena pesada (Hc) y cadena liviana humana kappa (hK) (Lc)
20 de IgG1 (hIgG1). Los anticuerpos activables comprenden el anticuerpo o su dominio de unión al antígeno de ipilimumab. El resto escindible se seleccionó del grupo que consiste en un resto escindible denominado en la presente como "2001" y que comprende la secuencia ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297) y
25 sus derivados y un resto escindible denominado en la presente

como "3001" y que comprende la secuencia AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306) y sus derivados. En algunas modalidades, el resto escindible se seleccionó del grupo que consiste en ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 297), también denominado en la presente como "2001"; ISSGLLSGRSDDH (SEQ ID NO: 300), también denominado en la presente como "2006"; ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 301), también denominado en la presente como "2007"; ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 302), también denominado en la presente como "2008"; ISSGLLSGRSDTH (SEQ ID NO: 303), también denominado en la presente como "2009"; ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 305), también denominado en la presente como "2012"; ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 304), también denominado en la presente como "2011"; ISSGLLSGRSANPRG (SEQ ID NO: 298), también denominado en la presente como "2003"; AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 306), también denominado en la presente como "3001"; AVGLLAPPGGLSGRSDDH (SEQ ID NO: 307), también denominado en la presente como "3006"; AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 308), también denominado en la presente como "3007"; AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 309), también denominado en la presente como "3008"; AVGLLAPPGGLSGRSDTH (SEQ ID NO: 310), también denominado en la presente como "3009"; AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 312), también denominado en la presente como "3012"; AVGLLAPPGGLSGRSDNP (SEQ ID NO: 311), también denominado en la presente como "3011"; y AVGLLAPPSGRSANPRG (SEQ ID NO: 299),

también denominado en la presente como "2005". El resto enmascarador se seleccionó del grupo de restos enmascaradores provistos en las Tablas 4 y 5. En algunas modalidades, el resto enmascarador fue CRTQLYGYNLCPY (SEQ ID NO: 39),
5 denominado en la presente como YV39. Algunos de los anticuerpos anti-CTLA-4 activables también incluyeron secuencias espaciadoras y/o péptidos ligadores.

Ejemplo 4:

Caracterización *in vitro* de los anticuerpos anti-CTLA-4
10 humano activables

Para evaluar la capacidad de los anticuerpos activables para unirse a CTLA-4 en ausencia de actividad de proteasa, se usó un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para medir la afinidad de unión. Brevemente, las
15 placas Nunc MaxiSorp® se recubrieron durante la noche a 40 °C con 100 µL/pocillo de una solución de 1 µg/ml de proteína CTLA-4 humana (Sino Biological) en PBS, pH 7.4. Las placas luego se lavaron tres veces con PBST (PBS, pH 7.4, Tween-20 0.05%) y los pocillos se bloquearon con 200 µL/pocillo,
20 albúmina de suero bovino (BSA) 10 mg/mL en PBST durante 2 horas a temperatura ambiente. Después, las placas se lavaron tres veces más con PBST. Los anticuerpos activables luego se diluyeron en forma seriada, como se muestra a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8. Dilución seriada de los anticuerpos anti-CTLA-4 activables para el análisis de unión

	[Anticuerpo] = nM Columnas 1-3	[anticuerpo activable 1] = nM Columnas 4-6	[anticuerpo activable 2] = nM Columnas 7-9	[anticuerpo activable 3] = nM Columnas 10-12
5 A	10	1000	1000	1000
B	3.33	333	333	333
C	1.11	111	111	111
D	0.37	37	37	37
E	0.123	12.3	12.3	12.3
F	0.041	4.1	4.1	4.1
G	0.0137	1.34	1.34	1.34
H	.0046	0.45	0.45	Blanco

En el ejemplo actual, la concentración más alta
 10 utilizada para el anticuerpo original y los anticuerpos
 activables fue de 10 nM y 100 nM, respectivamente. Sin
 embargo, las concentraciones se pueden aumentar o disminuir
 para dar curvas de unión de saturación completa para
 anticuerpos activables con enmascaramiento más fuerte o más
 15 débil.

Los anticuerpos diluidos se añadieron a las placas
 y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después,
 las placas se lavaron tres veces con PBST. Luego, se
 añadieron 100 µL de IgG antihumana de cabra (Fab específico,
 20 Sigma cat# A0293; diluido a 1: 4.000 en BSA 10 mg/mL en PBST)
 a cada pocillo, y la placa se incubó durante 1 hora adicional
 a temperatura ambiente. A continuación, las placas se
 desarrollaron con tetrametilbenzidina (TMB) y HCl 1N. Luego
 se midió la absorbancia a 450 nm y se informó como densidad
 25 óptica (DO 450 nm).

Como se muestra en las FIGs. 3A a 3E, todos los anticuerpos anti-CTLA-4 activables típicamente tenían una unión reducida a CTLA-4 en comparación con ipilimumab ("YV1"). Ver también FIGs. 4A a 4D, FIGs. 5A a 5F y FIGs. 6A a 6B.

5 Tales datos demuestran que los restos enmascaradores ocultan eficazmente el dominio de unión a antígeno en los anticuerpos anti-CTLA-4 activables

Para evaluar adicionalmente la capacidad de unión, los anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables se diluyeron en
10 forma seriada (por ejemplo, 60 µg/ml a 0.0003 µg/ml) y se añadieron a 58 células α - β -CTLA-4/CD3 ζ , que expresan de forma estable CTLA-4 humana. Después de 30 minutos de incubación a 4°C, se añadió un anticuerpo secundario antihumano marcado con aloficocianina (APC) y se evaluó la unión de los
15 anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables al CTLA-4 humano utilizando un citómetro de flujo Canto. La intensidad de fluorescencia media geométrica (GMFI) se determinó utilizando el software de análisis FlowJo®. Ipilimumab se usó como control. Como se muestra en las FIGs. 7A y 7B, los
20 anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables no se unieron a CTLA-4 humano tan eficazmente como ipilimumab. Estos datos demuestran además que, en ausencia de proteasas específicas, el resto enmascarador de los anticuerpos activables inhibe la unión de tales anticuerpos activables al CTLA-4 humano.

25 Para confirmar que la unión reducida observada con

los anticuerpos anti-CTLA-4 activables se debió al resto enmascarador, los estudios se realizaron en formas mono-cortadas, MMP completamente cortadas y uPA completamente cortadas del anticuerpo activable que comprende YV39 como el

5 resto enmascarador y 2011 como el resto escindible. La forma mono-cortada del anticuerpo se produjo mediante la expresión de un constructo que produce una cadena liviana intacta (que incluye el resto enmascarador) y una segunda cadena liviana truncada en la misma posición que si hubiera sido escindida

10 por MMP14. Las formas totalmente cortadas de MMP o uPA se expresaron a partir de constructos con ambas cadenas livianas truncadas como si hubieran sido escindidas por MMP o uPA, respectivamente. Como se muestra en las FIGS. 7C y 7D, el anticuerpo activable mono-cortado tenía unión intermedia (EC_{50}

15 = 2.8 nM) en comparación con el anticuerpo activable no cortado (EC_{50} = 22 nM) e ipilimumab (EC_{50} = 0.54 nM). Por el contrario, los anticuerpos activables totalmente cortados de MMP o uPA se comportaron de manera similar a ipilimumab (MMP cortado: EC_{50} = 0.65 nM; uPA cortado: EC_{50} = 0.76). Tales

20 datos confirman que la unión reducida observada con el anticuerpo anti-CTLA-4 activable se debe al resto enmascarador.

A continuación, para determinar si la unión a CTLA-4 reducida observada se correlacionaba con actividad reducida,

25 la actividad de un anticuerpo anti-CTLA-4 humano activable

que comprende YV39 como el resto enmascarador y 2011 como el resto escindible ("Ipi YV39 2011") se caracterizó en un ensayo funcional *in vitro* usando enterotoxina B estafilocócica (SEB). SEB es un superantígeno que activa fuertemente las células T y estimula la secreción de citoquinas. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) frescas enteras de donantes humanos sanos usando un método de separación de Ficoll-Paque estándar. Se realizó la dilución seriada de los anticuerpos (por ejemplo, 40 µg/ml a 0.01 µg/ml) y se sembraron por triplicado en una placa de cultivo tisular de fondo plano de 96 pocillos. Los anticuerpos utilizados incluyeron (i) Ipi YV39 2011, (ii) ipilimumab y (iii) un control de isotipo no relacionado. A continuación, las PBMC aisladas se resuspendieron en medio de ensayo de células T (medio RPMI + suero bovino fetal inactivado por calor 10% (HI-FBS) + amortiguador HEPES 1%+ aminoácido no esencial MEM 1% + Na-piruvato 1%) y se agregó a la placa a 1x10⁵ células/pocillo. Las células se estimularon con una concentración subóptima (por ejemplo, 85 ng/ml, determinada por la titulación de SEB y observación de la estimulación sobre la proliferación de células T) de SEB. Las células se incubaron a 37°C durante 3 días. Luego, la concentración de IL-2 en los sobrenadantes se midió mediante fluorescencia resuelta en el tiempo homogénea (HTRF). Los datos HTRF se analizaron usando Softmax Pro y se graficaron

usando GraphPad Prism.

Como se muestra en la FIG. 8, el ipilimumab mejoró la producción de IL-2 mediada por SEB por las PBMC de una manera dependiente de la dosis. Por el contrario, el anticuerpo activable Ipi YV39 2011 tenía una actividad similar a la del control de isotipo, lo que sugiere que el resto enmascarador (YV39) es efectivo para bloquear la actividad funcional de ipilimumab. Estos datos están de acuerdo con los datos de unión descritos anteriormente y demuestran que, en ausencia de proteasas específicas, los anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables exhiben la actividad reducida.

Ejemplo 5:

Caracterización *in vivo* de los anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables

Con el fin de caracterizar los anticuerpos descritos en la presente *in vivo*, se prepararon cuatro anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables humanos (basados en ipilimumab) usando IgG2a de ratón. Los anticuerpos comprenden YV04, YV23, YV24 o YV39 como resto enmascarador y 2001 como resto escindible ("Ipi YV04 2001", "Ipi YV23 2001", "Ipi YV24 2001" e "Ipi YV39 2001", respectivamente). Como controles, se usaron ipilimumab ("Ipi mg2a") y una toxina anti-diftérica humana no relacionada ("control mg2a"). La actividad de estos anticuerpos anti-CTLA-4 activables se evaluó usando el modelo

de tumor MC38 como se describe a continuación.

En resumen, en el día 0, se inyectaron por vía subcutánea ratones C57BL/6 knock-in CTLA-4 humano con 2×10^6 de células de adenocarcinoma de colon MC38 en su cuadrante abdominal inferior izquierdo. Los tumores se midieron con calibres bidimensionales, y el volumen tumoral se calculó como $L \times (W^2/2)$, L = longitud (la más larga de las 2 mediciones), W = ancho. A continuación, los ratones se dividieron en forma aleatoria en diferentes grupos, de modo de tener un volumen tumoral medio similar (por ejemplo, 37 mm³). La administración de los anticuerpos comenzó en el día 7 después de la implantación del tumor con los ratones que recibieron una dosis única (por ejemplo, 200 µg/ratón) del anticuerpo relevante mediante inyección intraperitoneal (i.p.). En el día 12 después de la implantación del tumor, se sacrificaron varios de los ratones de cada grupo, y se recolectaron el tumor y el bazo para el inmunomonitorio para investigar el efecto de los anticuerpos en las poblaciones de células T. Algunos o todos los ratones restantes de los diferentes grupos se usaron para el posterior análisis farmacocinético (PK) y/o farmacodinámico (PD).

Inmunomonitorio de las poblaciones de células T

El tumor y el bazo recolectados se procesaron en un gentleMACS Octo Dissociator™ (Miltenyi, San Diego, CA). Las suspensiones de células individuales se tiñeron con los

siguientes marcadores de células T: CD4, CD8, CD19, ICOS, CD45, FoxP3, CTLA-4, CD3, Ki-67, PD-1, Granzyme B, y LIVE/DEAD®.

Análisis PK/PD

5 Los ratones se examinaron diariamente por cambios de postura, de aseo y respiratorios, así como por letargo. Los tumores y los pesos corporales del grupo se registraron dos veces por semana hasta la muerte, eutanasia o final del período de estudio. La respuesta a los tratamientos se midió
10 como una función de la inhibición del crecimiento tumoral (TGI), que se calculó de la siguiente manera: $\% \text{ TGI} = \{1 - [(T_t - T_o) / (C_t - C_o)]\} \times 100$, T_t = volumen tumoral del grupo de tratamiento en un día determinado, T_o = volumen tumoral inicial, C_t = volumen tumoral del grupo control en un día
15 determinado, C_o = volumen tumoral inicial del grupo control. Se practicó la eutanasia a animales si el tumor alcanzaba un volumen mayor de aproximadamente 2500 mm³ o aparecía ulcerado.

Análisis estadístico

Se utilizó Microsoft Excel para calcular la media,
20 la desviación estándar (SD) y los valores promedios del volumen tumoral y el peso corporal. Los valores medios y promedios se calcularon cuando el 100% y al menos el 60% de los animales de estudio permanecieron en cada grupo de tratamiento, respectivamente. El software GraphPad Prism® v.4
25 se utilizó para graficar los datos.

Como se esperaba, los ratones que recibieron el anticuerpo control no relacionado no lograron controlar el crecimiento del tumor (FIG. 9A), mientras que todos los ratones que recibieron ipilimumab controlaron efectivamente el crecimiento del tumor (FIG. 9B). Los ratones que recibieron los diferentes anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables controlaron el crecimiento del tumor en forma comparable con ipilimumab (FIGs. 9C a 9F). De los anticuerpos activables, Ipi YV39 2001 se asemejó más estrechamente a la eficacia de ipilimumab en el control del crecimiento tumoral (FIG. 9F).

De acuerdo con la frecuencia de las células T reguladoras en el tumor y bazo de los ratones tratados, como se observó anteriormente con los anticuerpos anti-CTLA-4 de ratón activables (ver Ejemplo 2), los anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables (isotipo IgG2a de ratón) se comportaron de manera similar a ipilimumab en tumores (FIGs. 12A y 12B), pero en el bazo, los anticuerpos activables fueron más comparable al anticuerpo de control no relacionado (FIGs. 12C a 12F).

Los datos mostrados aquí colectivamente demuestran que los anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables descritos en la presente pueden controlar efectivamente tumores como el ipilimumab tradicional mientras que presentan menos riesgo de efectos secundarios indeseables.

Ejemplo 6:

Caracterización *in vivo* de anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables que comprenden restos escindibles modificados

Para abordar un posible sitio de desamidación en
5 ciertas secuencias de restos escindibles (ver Ejemplo 10), se prepararon anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables usando una IgG1 humana y diversas secuencias de CM. Los anticuerpos activables comprenden YV39 como resto enmascarador y una de varias variantes del resto escindible 2001: WT (2001), ANP
10 (2012), DNP (2011) o Q (2008) ("Ipi YV39 2001", "Ipi YV39 2012", "Ipi YV39 2011", e "Ipi YV39 2008", respectivamente). Ipilimumab y la toxina anti-difteria humana no relacionada se usaron de nuevo como controles.

Para medir la actividad de los anticuerpos anti-
15 CTLA-4 activables, se usó el modelo de tumor MC38 como se describió anteriormente en el Ejemplo 5. Para el estudio de titulación de dosis (FIG 11A a 11F), los ratones se trataron con ipilimumab o el anticuerpo activable que comprende YV39 como el resto enmascarador y 2011 como el resto escindible
20 ("Ipi YV39 2011") a dosis de 200 µg/dosis, 60 µg/dosis y 20 µg/dosis.

Como se muestra en las FIGS. 10A y 10B, los ratones tratados con el anticuerpo control no controlaron el tumor, mientras que 6 de cada 10 ratones tratados con ipilimumab
25 estaban libres de tumor al final del experimento. Los ratones

tratados con los diferentes anticuerpos activables pudieron controlar el tumor como se observó con el ipilimumab tradicional (FIG. 10C a 10F). Ver también las FIGS. 11B - 11G.

De acuerdo con la frecuencia de las células T reguladoras en el tumor y bazo de los ratones tratados, como se observó con anterioridad, se requirió proteasa específica de tumor para escindir las variantes del resto escindible 2001. En los tumores, estos anticuerpos activables se comportaron como ipilimumab en la reducción de la frecuencia de células T reguladoras Foxp3 + (FIGs. 13A, 13B, 14A y 14B). Ver también FIG. 15. En el bazo, los anticuerpos reflejaron más estrechamente el anticuerpo de control no relacionado (FIGs. 13C a 13E, 14D a 14G, y 16A a 16B), lo que demuestra que el resto enmascarador permanece acoplado al anticuerpo activable en ausencia de las proteasas específicas asociadas al tumor.

Ejemplo 7:

Caracterización *in vivo* de una versión no fucosilada de los anticuerpos anti-CTLA-4 humano activables

Como se describió anteriormente, la ausencia de restos de fucosa central puede potenciar fuertemente la ADCC a través de la unión mejorada de IgG a FcγRIIIA de activación sin alterar la unión al antígeno o CDC. Natsume *et al.* (2009) *Drug Des. Devel. Ther.* 3:7. Se prepararon formas no fucosiladas de ipilimumab ("Ipi NF") e ipi YV39 2011 ("Ipi

YV39 2011 NF"). Se determinó la unión de Ipi e Ipi NF para diversos receptores Fc de ratón, ser humano y mono cynomolgus. Los resultados se proporcionan en la FIG. 19. Como se esperaba, Ipi NF mostró una afinidad drásticamente mejorada
 5 (es decir, K_d inferior) para activar los receptores CD16a humano (FcγRIIIa), CD16 de cyno (FcγRIII) y FcγRIV de ratón.

Se analizaron Ipi YV39 2011 NF e Ipi-NF a varias dosis en el modelo tumoral MC38 descrito en el Ejemplo 5. Se usaron ipilimumab y una hIgG1 no relacionada como controles.
 10 Los resultados se proporcionan en las Figs. 17A - D. Ipi NF fue algo más efectivo para limitar o prevenir el crecimiento tumoral que ipilimumab (comparar las FIGS. 17B y 17C), e Ipi YV39 2011 NF fue equivalente a Ipi NF (comparar las FIGS. 17C y 17D). Además, las células T reguladoras FoxP3+ también se
 15 redujeron de manera similar en los tumores de ratones tratados con anticuerpo Ipi NF e Ipi YV39 2011 (ver FIG. 18). En ambos experimentos, se muestra que el Ipi YV39 2011 NF está completamente activado en el tumor.

Estos resultados confirman que los métodos de la
 20 presente invención son igualmente aplicables a las formas no fucosiladas de ipilimumab, incluidos los anticuerpos CTLA-4 activables no fucosilados tales como YV39 2011 NF.

Ejemplo 8:

Caracterización *in vivo* de anticuerpos anti-CTLA-4 humano
 25 activables en monos Cynomolgus

Para evaluar los anticuerpos anti-CTLA-4 en un primate, a los monos cynomolgous se les administró anticuerpo activable que comprende YV39 como el resto enmascarador y 2001 como el resto escindible. El vehículo y el ipilimumab se usaron como controles. Cada mono recibió 10 mg de anticuerpo o anticuerpo anti-CTLA-4 activable, y se recogió sangre los días 0, 4, 8, 15, 22, 36 y 43 después de la administración del anticuerpo. Como se muestra en la FIG. 20, en los monos que recibieron ipilimumab, hubo un pico en la proliferación de las células T CD4+ medido por la tinción de Ki67 alrededor de los días 8-15 después de la administración del anticuerpo. Por el contrario, el anticuerpo anti-CTLA-4 activable se comportó de manera similar al control del vehículo y no indujo la proliferación de células T CD4+ en los monos. Estos datos demuestran que incluso en primates, el anticuerpo anti-CTLA-4 activable muestra poca o ninguna activación, lo que indica la ausencia de proteasas específicas.

Colectivamente, los datos presentados en las FIGs. 1-20 demuestran que los anticuerpos anti-CTLA-4 activables descritos en la presente ofrecen una mejora con respecto al ipilimumab. Los anticuerpos activables controlan el crecimiento del tumor tan efectivamente como el ipilimumab mientras que reducen el riesgo de eventos adversos graves que a menudo se observan con el tratamiento con ipilimumab.

Ejemplo 9:

Valores de K_{app} y ME para los anticuerpos CTLA-4 activables

La Tabla 9 proporciona los valores de K_{app} y eficacia de enmascaramiento (ME) para anticuerpos activables, descritos en la presente, que comprenden una variedad de restos enmascaradores y restos escindibles en un formato de IgG1 humana. Los valores proporcionados en esta Tabla se calcularon a partir de los datos representados en las Figuras. K_{app} representa la afinidad de unión del anticuerpo activable en las condiciones de la medición, en este ejemplo unión mediante ELISA; debe apreciarse, sin embargo, que la afinidad de unión también se puede medir mediante la unión a CTLA-4 expresada en células primarias o transfectadas o mediante otros métodos físicos tales como, pero sin limitación, resonancia por plasmón superficial o diálisis en equilibrio. La eficacia de enmascaramiento (ME) se calcula dividiendo la K_{app} del anticuerpo activable por la KD de ipilimumab, medidas en las mismas condiciones.

Tabla 9: Valores de K_{app} y ME

	CM 2001		CM 3001		CM 2008		CM 2011		CM 2012		NSUB	
	K_{app} nM	ME	K_{app} nM	ME	K_{app} nM	ME	K_{app} nM	ME	K_{app} nM	ME	K_{app} nM	ME
YV04-YV1	17.8	57										
YV06-YV1	0.6	2										
YV09-YV1	33.6	112	44.4	126								
YV23-YV1	11.4	38	13.8	39								
YV24-YV1			9.0	29								
YV27-YV1	0.7	2.3	0.8	2.3								
YV29-YV1	0.7	2.3	0.8	2.3								
YV32-YV1	0.9	3.0	1.2	3.4								
YV33-YV1	1.3	4.3	1.9	5								
YV35-YV1	3.7	12.3	5.3	15								
YV39-YV1	16.9	56	14.3	41	31.4	135	13.2	57	14.9	64	31.8	137
YV41-YV1	14.4	48	22.6	65								

YV51-YV1	4.4	15	4.9	14								
YV52-YV1	0.8	2.7	0.9	2.6								
YV53-YV1	4.1	14	5.3	15								
YV54-YV1	0.6	2	1.0	2.8								
YV55-YV1	4.8	16	6.0	18								
YV56-YV1	0.4	1.3	0.4	1								
YV57-YV1	0.4	1.3	1.6	4.6								
YV58-YV1	0.3	1	0.4	1								

La Tabla 10 proporciona los valores de K_{app} y ME para los anticuerpos activables descritos en la presente, que comprende una variedad de restos enmascaradores y restos escindibles en un formato de Ig2a de ratón YV1. Los valores provistos se calcularon a partir de los datos representados en las Figuras.

10

Tabla 10: Valores de K_{app} y ME

	CM 2001		CM 2006		CM 2007		CM 2008		CM 2009	
	K_{app} nM	ME	K_{app} nM	ME	K_{app} nM	ME	K_{app} nM	ME	K_{app} nM	ME
YV04-YV1	5.7	16.2	26.4	75	19.3	55	19.1	54	16.4	47
YV23-YV1			12.5	36	7.8	22	2.7	8	9.4	27
YV39-YV1	18.0	51	23.9	68			17.6	50	18.0	51

La Tabla 11 proporciona los valores de K_{app} y ME para los anticuerpos activables que comprenden restos enmascaradores que tienen valores de ME más altos y el resto escindible 2012 en un formato de Ig2a de ratón aYV1. Los valores provistos se calcularon a partir de los datos representados en las Figuras.

20

Tabla 11: Valores de K_{app} y ME

	CM 2001		CM 2011		CM 2012		NSUB	
	K_{app} nM	ME	K_{app} nM	ME	K_{app} nM	ME	K_{app} nM	ME
YV39-YV1	18.0	51	18.0	51	12.9	144	29.8	85
YV61-YV1					17.9	200		
YV62-YV1					15.5	173		
YV63-YV1					104	1170		
YV64-YV1					56.5	631		
YV65-YV1					12.3	156		
YV66-YV1					18.9	242		
YV01-YV1					38.6	493		
YV02-YV1					14.8	189		

25

Ejemplo 10:

Evaluación de desamidación, isomerización y estabilización
para los anticuerpos CTLA-4 activables

Como se sugiere en el Ejemplo 6, para dirigirse a
5 un posible sitio de desamidación en ciertas secuencias del
resto escindible (CM) en ciertos anticuerpos anti-CTLA-4
humano activables, tales anticuerpos activables se prepararon
usando varias secuencias de CM (es decir, 2001, 2011, 2012 y
2008). En los restos escindibles 2011, 2012 y 2008, la
10 secuencia de DNH encontrada en el resto escindible de 2001 se
reemplazó con DNP, ANP y DQH, respectivamente.

Estos anticuerpos CTLA-4 activables se produjeron
por transfección transitoria de los constructos relevantes en
células HEK 293, y se sometieron a mapeo peptídico por
15 cromatografía líquida - espectroscopía de masas (LC-MS) para
detectar posibles productos de degradación. El resto
escindible 2001 (DNH), que se seleccionó inicialmente para
uso en los anticuerpos anti-CTLA-4 activables de la presente
invención, mostró desamidación del residuo de asparagina (N)
20 (6.4%) después de 7 días en PBS a 4°C. Los estudios de
estabilidad forzada mostraron un aumento de desamidación de
18.5% a 32.8% cuando se almacenaron a 25°C durante 4 semanas,
y al 36.5% y 66.6% cuando se almacenaron a 40°C durante una
semana y cuatro semanas, respectivamente.

25 Se seleccionaron los restos escindibles 2008, 2011

y 2012 para tratar de superar el problema de desamidación con 2001 en estos anticuerpos CTLA-4 activables. Todos estos tenían un 0.1% o menos de desamidación cuando se almacenaron a 40°C durante una semana en PBS, en comparación con el 6.4% de desamidación de 2001. Sin embargo, el análisis de estabilidad adicional (también por LC-MS) mostró que si bien estos anticuerpos CTLA-4 activables que comprenden el resto escindible de 2008 (DQH) exhibieron una desamidación mínima, mostró isomerización de aspartato significativa en el residuo de aspartato en diversas condiciones (ver Tabla 12). Por el contrario, 2011 (DNP) exhibió una isomerización de aspartato mínima. La isomerización de aspartato no fue relevante para 2012 (ANP), en que el residuo de aspartato se reemplaza con alanina.

Tabla 12: Valores de isomerización

Temperatura	Tiempo	Resto escindible – Valores de isomerización		
		2011 (DNP)	2012 (ANP)	2008 (DQH)
-80°C	0 días (T ₀)	0.1%	N/A	1.8%
4°C	0 días (T ₀)	0.1%	N/A	2.4%
25°C	3 meses	0.2%	N/A	8.2%
40°C	3 meses	0.2%	N/A	34.5%

Sin embargo, los estudios de estabilidad *in vitro* en suero de ratón, rata y mono cynomolgus mostraron un corte sustancial entre los residuos de asparagina y prolina para 2012 (ANP) (ver Tabla 13) en estos anticuerpos CTLA-4 activables. 2011 (DNP) permaneció como el resto escindible con niveles aceptablemente bajos de desamidación, isomerización de aspartato y corte de cadena liviana.

Tabla 13: Grado de corte observado entre los

residuos de asparagina y prolina

Suero	Resto escindible – Corte entre los residuos de Asparagina y Prolina	
	2011 (DNP)	2012 (ANP)
Ratón	-	++
Cyno	+/-	+++

5 Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de
patente, sitios de Internet y números de acceso/secuencias de
bases de datos (que incluyen secuencias de polinucleótidos y
polipéptidos) citados en la presente se incorporan por
referencia en su totalidad para todos los propósitos en la
misma medida que si cada publicación, patente, solicitud de
10 patente, sitio de internet o número de acceso/secuencia de la
base de datos individual se indicara específica e
individualmente para ser así incorporados por referencia.

15

20

25