

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 655**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2016** **PCT/US2016/034508**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016** **WO16196237**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2016** **E 16728509 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020** **EP 3303394**

54 Título: **Aticuerpos anti-CTLA-4 y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

29.05.2015 US 201562168391 P
19.06.2015 US 201562182363 P
09.07.2015 US 201562190653 P
18.11.2015 US 201562257202 P
19.01.2016 US 201662280263 P
08.02.2016 US 201662292500 P
12.02.2016 US 201662294558 P
15.04.2016 US 201662323226 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
28.01.2021

73 Titular/es:

AGENUS INC. (33.3%)
3 Forbes Road
Lexington MA 02421, US;
LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH
LTD (33.3%) y
MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER
CENTER (33.3%)

72 Inventor/es:

VAN DIJK, MARC;
MUNDT, CORNELIA, ANNE;
RITTER, GERD;
SCHAER, DAVID;
WOLCHOK, JEDD, DAVID;
MERGHOU, TAHA;
SAVITSKY, DAVID, ADAM;
FINDEIS, MARK, ARTHUR y
WILSON, NICHOLAS, STUART

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 803 655 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-CTLA-4 y métodos de uso de los mismos

1. CAMPO

La presente divulgación se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a CTLA-4 humano y a métodos de uso de los mismos.

2. ANTECEDENTES

Los linfocitos T son fundamentales para la respuesta inmune adaptativa al antígeno. Se requieren al menos dos señales para la activación completa de células T naíf (Bretscher 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:185-90). Una primera señal específica para el antígeno es proporcionada por la interacción del receptor de células T (TCR) con el complejo MHC/péptido en una célula presentadora de antígeno (APC). Una segunda señal co-estimuladora es proporcionada por las interacciones entre receptores en la célula T y sus ligandos en una célula presentadora de antígeno (APC). El acoplamiento tanto de las interacciones TCR/MHC como co-estimuladoras conduce a la activación de las células T a través de un cierto número de vías intracelulares, incluyendo la calcio-calcineurina y la proteína quinasa activada por mitógenos RAS, y la posterior activación de factores de transcripción para un cierto número de compuestos efectores, incluyendo citoquinas tales como IL-2. Estos eventos conducen a la proliferación de células T, a la generación de una agrupación de células T CD4⁺ auxiliares (T^H) y a la expansión de células T CD8⁺ citotóxicas activadas. La co-estimulación no solo es crítica para la activación completa de las células T, sino que su ausencia durante el acoplamiento de TCR/MHC produce anergia y/o apoptosis.

Múltiples vías co-estimuladoras positivas y negativas están implicadas en la regulación de las células T, sin embargo, las más críticas están entre CD28 en células T y B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) en APC. CD28 fomenta la diferenciación de células T en células de fenotipo TH1 y potencia la producción de anticuerpos por parte de las células B y la activación de células T. B7-1 y B7-2, expresados en APC, tales como células dendríticas (DC) y células B, tienen funciones solapantes, pero distintas. B7-2 se expresa constitutivamente y se regula al alza rápidamente en APC coincidente con el acoplamiento TCR/MHC (señal 1). La expresión de B7-1 es muy baja en la célula en reposo, pero típicamente es inducida después de una estimulación prolongada de células T. Estas diferencias sugieren que si bien B7-2 puede ser importante en el inicio de la activación de células T, B7-1 puede desempeñar un papel más importante en perpetuar la respuesta inmune.

Después de la activación de las células T, se regula al alza un receptor regulador negativo del Antígeno-4 asociado al linfocito T Citotóxico (CTLA-4) en las células T (Alegre et al., 2001, Nat Rev Immunol 1:220-8). CTLA-4 es estructuralmente homólogo a CD28, pero se une más fuertemente a los ligandos B7-1 y B7-2. CTLA-4 inhibe la respuesta inmune de varias maneras: compite con CD28 por los ligandos B7 y, por lo tanto, bloquea la co-estimulación; señaliza negativamente para inhibir la activación de células T; y puede capturar CD80 y CD86 de células opuestas por trans-endocitosis, lo que da como resultado una co-estimulación deteriorada a través de CD28 (Krummel y Allison, 1995, J Exp Med 182:459-465; Walunas et al., 1994, Immunity 1:405-413; Qureshi et al., 2011, Science 332:600-603). El documento WO 2009/100140 A1 describe anticuerpos monoclonales que se unen a CTLA-4.

Dado el papel crítico de la vía co-estimuladoras de B7 en el fomento y el mantenimiento de una respuesta inmune, los agentes terapéuticos diseñados para antagonizar esta vía son prometedores para el tratamiento de enfermedades y trastornos autoinmunes.

3. SUMARIO

La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen específicamente a CTLA-4 humano y antagonizan la función de CTLA-4, p. ej., la supresión inmune mediada por CTLA-4. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos, ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos, vectores de expresión y células huésped para producir estos anticuerpos, y métodos para tratar a un sujeto utilizando estos anticuerpos. Los anticuerpos descritos en esta memoria son particularmente útiles para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno (p. ej., un antígeno tumoral) y/o disminuir la supresión inmune mediada por Treg y, por lo tanto, para tratar el cáncer en un sujeto. La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

(a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SYX₁MX₂ (SEQ ID NO: 22), en donde X₁ es S o A; y X₂ es N o S;

(b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SSSSSSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 2);

(c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de VGLMGPFIXI (SEQ ID NO: 23), en donde X es D o N;

(d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID NO: 24), en donde X₁ es S o G; X₂ es R, S o T; y X₃ es G o A;

5 (e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID NO: 25), en donde X₁ es G o A; X₂ es A o T; y X₃ es T, S, R o N; y

(f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de QQYGX₁SPX₂T (SEQ ID NO: 26), en donde X₁ es S o T; y X₂ es W o F.

10 En determinados aspectos, la CDRH1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1 y 27. En determinados aspectos, la CDRH3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 3 y 28. En determinados aspectos, la CDRL1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 4, 29 y 30. En determinados aspectos, la CDRL2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 5 y 31-35. En determinados aspectos, la CDRL3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 6, 36 y 37. En determinados aspectos, CDRH1, CDRH2 y CDRH3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente, recogidas en SEQ ID NOS: 1, 2 y 3; 27, 2 y 3; o 27, 2 y 28. En determinados aspectos, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente, recogidas en SEQ ID NOS: 4, 5 y 6; 29, 32 y 36; 29, 33 y 37; 30, 31 y 6; 29, 34 y 6; o 29, 35 y 37. En el anticuerpo de la invención, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos recogidas en SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, y 6, respectivamente.

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

25 (a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SYX₁MX₂ (SEQ ID NO: 22), en donde X₁ es S o A; y X₂ es N o S;

(b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SSSSSSIYYADSVKG (SEQ ID NO: 2);

(c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de VGLMGPFIXI (SEQ ID NO: 23), en donde X es D o N;

30 (d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID NO: 24), en donde X₁ es S o G; X₂ es R, S o T; y X₃ es G o A;

(e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID NO: 25), en donde X₁ es G o A; X₂ es A o T; y X₃ es T, S, R o N; y

(f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de QQYGX₁SPX₂T (SEQ ID NO: 26), en donde X₁ es S o T; y X₂ es W o F.

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

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

50 En determinados aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y 38-42. En

determinados aspectos, la región variable de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 7 y 38-42. La región variable de la cadena pesada del anticuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de la línea germinal IGHV3-21 humana (p. ej., IGHV3-21 * 01, p. ej., que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9).

En determinados aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75% , 80%, 85%, 90%, 95% o 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8 y 43-47. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 8 y 43-47. El anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de la línea germinal IGKV3-20 humana (p. ej., IGKV3-20 * 01, p. ej., que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10) o una secuencia de la línea germinal IGKV3-11 humana (p. ej., IGKV3-11 * 01, p. ej., que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11).

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

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 8 y 43-47.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera, respectivamente, comprenden las secuencias de aminoácidos recogidas en SEQ ID NOs: 7 y 8; 7 y 44; 7 y 45; 38 y 8; 38 y 45; 39 y 43; 39 y 45; 39 y 46; 39 y 47; 40 y 43; 40 y 8; 40 y 44; 40 y 45; 41 y 8; 41 y 44; 41 y 45; 41 y 47; 42 y 43; o 42 y 45. El anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

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

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que compite de forma cruzada por la unión a la proteína CTLA-4 humana con un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de las cadenas pesada y ligera recogidas en SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une al mismo epítipo en la proteína CTLA-4 humana que un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de las cadenas pesada y ligera recogidas en SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo que se une a un epítipo de CTLA-4 humana. En determinados aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de CTLA-4 humana que comprende, consiste esencialmente en o consiste en los residuos 140-141 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de CTLA-4 humana que consiste en los residuos 140-141 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, el anticuerpo se une a al menos un residuo de CTLA-4 humana seleccionado del grupo que consiste en los residuos 140 y 141 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de CTLA-4 humana que comprende, consiste esencialmente en o consiste en los residuos 140-143 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de CTLA-4 humana que consiste en los residuos 140-143 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de CTLA-4 humana que comprende, consiste esencialmente en o consiste en los residuos 135-143 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de CTLA-4 humana que consiste en los residuos 135-143 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de CTLA-4 humana que comprende, consiste esencialmente en o consiste en los residuos 140-149 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de CTLA-4 humana que consiste en los residuos 140-149 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de CTLA-4 humana que comprende, consiste esencialmente en o consiste en los residuos 135-149 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de CTLA-4 humana que consiste en los residuos 135-149 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de CTLA-4 humana que comprende, consiste esencialmente en o consiste en los residuos 80-82 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, el anticuerpo se une a un epítipo de CTLA-4 humana que consiste en los residuos 80-82 de SEQ ID NO: 77.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un anticuerpo para el cual, tras la unión del anticuerpo a la proteína CTLA-4 humana, seguida por la adición de deuterio, el intercambio de hidrógeno en la proteína CTLA-4 humana con deuterio en una región que comprende los residuos 140-141 de SEQ ID NO: 77 se reduce sustancialmente en relación con el intercambio de hidrógeno en la proteína CTLA-4 humana con deuterio en la misma región en ausencia del anticuerpo, según se determina por intercambio de hidrógeno/deuterio. En determinados aspectos, la región de CTLA-4 humana comprende los residuos 140-143 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, la región de CTLA-4 humana comprende los residuos 135-143 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, la región de CTLA-4 humana comprende los residuos 140-149 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, la región de CTLA-4 humana comprende los residuos 135-149 de SEQ ID NO: 77. En determinados aspectos, tras la unión del anticuerpo a la proteína CTLA-4 humana, seguida de la adición de deuterio, el intercambio de hidrógeno en la proteína CTLA-4 humana con deuterio en una región que comprende los residuos 80-82 de SEQ ID NO: 77 se reduce sustancialmente en relación con el intercambio de hidrógeno en la proteína CTLA-4 humana con deuterio en la misma región en ausencia del anticuerpo, según se determina por el intercambio de hidrógeno/deuterio.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂ humanas. En determinadas realizaciones, la región constante de la cadena pesada es IgG₁. En determinadas realizaciones, la región constante de la cadena pesada es IgG₂. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en IgGk e IgGl humanas.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de IgG humana que es una variante de una región constante de la cadena pesada de IgG humana de tipo salvaje, en donde la región constante de la cadena pesada de IgG humana variante se une a receptores Fc gamma humanos seleccionados del grupo que consiste en FcγRIIB y FcγRIIA con mayor afinidad que la región constante de cadena pesada de la IgG humana de tipo salvaje se une a los receptores Fc gamma humanos. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de IgG humana que es una variante de una región constante de la cadena pesada de IgG humana de tipo salvaje, en donde la región constante de la cadena pesada de IgG humana variante se une a FcγRIIB humano con mayor afinidad que la región constante de la cadena pesada de IgG humana de tipo salvaje se une a FcγRIIB humano. En determinadas realizaciones, la región constante de la cadena pesada variante de IgG humana es una IgG₁ humana variante, una IgG₂ humana variante o una región constante de la cadena pesada de IgG₄ humana variante. En determinadas realizaciones, la región constante de la cadena pesada de IgG humana variante comprende una o más de las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE: G236D, P238D, S239D, S267E, L328F y L328E. En determinadas realizaciones, la región constante de la cadena pesada de IgG humana variante comprende un conjunto de mutaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: S267E y L328F; P238D y L328E; P238D y una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en E233D, G237D, H268D, P271G, y A330R; P238D, E233D, G237D, H268D, P271G, y A330R; G236D y S267E; S239D y S267E; V262E, S267E, y L328F; y V264E, S267E, y L328F, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. En determinadas realizaciones, la región constante de la cadena pesada de IgG humana variante comprende, además, una o más mutaciones de aminoácidos que reducen la afinidad de la IgG por FcγRIIA humano, FcγRIIA humano o FcγRI humano. En determinadas realizaciones, el FcγRIIB se expresa en una célula seleccionada del grupo que consiste en macrófagos, monocitos, células B, células dendríticas, células endoteliales y células T activadas.

- En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada de IgG humana que es una variante de una región constante de la cadena pesada de IgG humana de tipo salvaje, en donde la región constante de la cadena pesada de IgG humana variante se une a los receptores Fc gamma humanos con mayor afinidad que la región constante de la cadena pesada de IgG humana de tipo salvaje se une a los receptores Fc gamma humanos. En determinadas realizaciones, el receptor Fc gamma humano comprende un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptor (IT AM). En determinadas realizaciones, el receptor Fc gamma humano se selecciona del grupo que consiste en FcγRIIIA, FcγRIIA y FcγRI. En determinadas realizaciones, el receptor Fc gamma humano es FcγRIIIA. En determinadas realizaciones, la región constante de la cadena pesada de IgG humana variante comprende una o más de las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE: G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305I, A330L, I332E, E333A, K334A, A339T y P396L. En determinadas realizaciones, la región constante de la cadena pesada de IgG humana variante comprende un conjunto de mutaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en: S239D; T256A; K290A; S298A; I332E; E333A; K334A; A339T; S239D e I332E; S239D, A330L, e I332E; S298A, E333A, y K334A; G236A, S239D, y I332E; y F243L, R292P, Y300L, V305I, y P396L, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE. En determinadas realizaciones, la región constante de la cadena pesada de IgG humana variante comprende las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE: S239D, A330L e I332E. En determinadas realizaciones, la región constante de la cadena pesada de IgG humana variante comprende las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE: S239D e I332E. En determinadas realizaciones, la región constante de la cadena pesada de IgG humana variante es una región constante de la cadena pesada de IgG₁ humana variante que comprende las siguientes mutaciones de aminoácidos, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE: S239D y I332E. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región Fc afucosilada. En determinadas realizaciones, el anticuerpo está formulado para el suministro intratumoral. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o la composición farmacéutica se administra por vía intratumoral. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se formula para el suministro a un ganglio linfático que drena el tumor. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o la composición farmacéutica se suministra a un ganglio linfático que drena el tumor. En determinadas realizaciones, el anticuerpo se formula para el suministro subcutáneo. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o la composición farmacéutica se suministra por vía subcutánea.
- En determinados aspectos, el receptor Fc gamma humano es FcγRIIc. En determinados aspectos, el receptor Fc gamma humano se expresa en una célula seleccionada del grupo que consiste en macrófagos, monocitos, células B y células dendríticas. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es antagonista de CTLA-4. En determinadas realizaciones, el anticuerpo inhibe la unión de la proteína CTLA-4 humana a CD80 humano o a CD86 humano.
- En determinados aspectos, el anticuerpo se conjuga a un agente citotóxico, agente citostático, toxina, radionucleido o marcador detectable.
- En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo de la presente invención para uso como un medicamento.
- Se describe el uso de un anticuerpo de la presente invención para preparar composiciones farmacéuticas o medicamentos para inmunoterapia. Preferiblemente, la inmunoterapia es para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno en un sujeto, opcionalmente para tratar el cáncer, o tratar o prevenir enfermedades infecciosas.
- En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo de la presente invención para uso como un agente de diagnóstico.
- En un aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de un anticuerpo de la presente invención para la detección *in vitro* de CTLA-4 humana en una muestra biológica.
- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que codifica una cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo descrito en esta memoria. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un vector que comprende el polinucleótido. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido o el vector. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para producir un anticuerpo que se une a CTLA-4 humana, comprendiendo el método cultivar la célula huésped de modo que se exprese el polinucleótido y se produzca el anticuerpo.
- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica descrita en esta memoria. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CTLA-4 o una composición farmacéutica descrita en esta memoria. La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado de la invención o una composición farmacéutica de la invención para uso en un método para: (a) el tratamiento del cáncer; y/o (b) el tratamiento de una enfermedad infecciosa. En determinadas

realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra por vía subcutánea o intravenosa. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra por vía intravenosa a razón de 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg o 10 mg/kg, opcionalmente en un intervalo de una vez cada tres semanas. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra por vía intratumoral. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra por vía intratumoral a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg, opcionalmente en un intervalo de una vez cada tres semanas. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra por vía intratumoral a razón de 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg o 0,3 mg/kg, opcionalmente en un intervalo de una vez cada tres semanas. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra por vía intratumoral a una dosis de hasta 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o 200 veces menos que una dosis dada por administración sistémica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra por vía intratumoral a una dosis que es hasta 10 veces menor que una dosis administrada por administración sistémica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra por vía intratumoral a una dosis que es hasta 100 veces menor que una dosis administrada por administración sistémica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra por vía intratumoral y el método comprende, además, administrar un agente terapéutico adicional al sujeto. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional se administra por vía sistémica. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene un tumor sólido y el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-PD-1. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es pembrolizumab o nivolumab. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-EGFR. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR es cetuximab. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene cáncer de mama HER2+ y el agente terapéutico adicional es un anticuerpo anti-HER2. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-HER2 es trastuzumab. En determinadas realizaciones, estos métodos comprenden, además, administrar un agente quimioterapéutico al sujeto. En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico se administra por vía sistémica. En determinadas realizaciones, el agente quimioterapéutico es gemcitabina. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra por vía intratumoral y el sujeto tiene un tumor sólido avanzado o metastásico. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra por vía intratumoral y el sujeto tiene cáncer de cabeza y cuello (p. ej., carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello recidivante/refractario). En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra por vía intratumoral y el sujeto tiene cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama HER2+ recidivante/refractario). En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra a un ganglio linfático que drena el tumor. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se suministra a través de una administración localizada (p. ej., administración subcutánea). En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra a través de una administración localizada (p. ej., administración subcutánea) a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se suministra a través de una administración localizada (p. ej., administración subcutánea) a una dosis de hasta 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o 200 veces menos que una dosis dada por administración sistémica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra a través de una administración localizada (p. ej., administración subcutánea) a una dosis que es hasta 10 veces menor que una dosis dada por administración sistémica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra a través de una administración localizada (p. ej., administración subcutánea) a una dosis que es hasta 100 veces menor que una dosis dada por administración sistémica. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se suministra a través de una administración localizada (p. ej., administración subcutánea) y el método comprende, además, administrar un agente terapéutico adicional al sujeto. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional es una vacuna. En determinadas realizaciones, la vacuna comprende un complejo peptídico de proteína de choque térmico (HSPPC) que comprende una proteína de choque térmico complejada con un péptido antigénico. En una realización, la proteína de choque térmico es proteína gp96 y está complejada con un péptido antigénico asociado al tumor, en donde el HSPPC se deriva de un tumor obtenido de un sujeto. En determinadas realizaciones, la proteína de choque térmico se selecciona del grupo que consiste en hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, gp96, calreticulina, un mutante de la misma y combinaciones de dos o más de las mismas. En determinadas realizaciones, la proteína de choque térmico es hsc70. En determinadas realizaciones, la proteína de choque térmico es hsp70. En determinadas realizaciones, el péptido antigénico es sintético. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene cáncer. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene una enfermedad infecciosa. En determinadas realizaciones, estos métodos comprenden, además, administrar un agente terapéutico adicional al sujeto. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente que fija como objetivo un punto de control. En determinadas realizaciones, el agente que fija como objetivo el punto de control se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo antagonista anti-PD-1, un anticuerpo antagonista anti-PD-L1, un anticuerpo antagonista anti-PD-L2, un anticuerpo antagonista anti-CTLA-4, un anticuerpo antagonista anti-TIM-3, un

- anticuerpo antagonista anti-LAG-3, un anticuerpo antagonista anti-CEACAM1, un anticuerpo agonista anti-GITR, un anticuerpo agonista anti-OX40 y un anticuerpo agonista anti-CD137, un agonista anticuerpo anti-DR3, un anticuerpo agonista anti-TNFSF14 y un anticuerpo agonista anti-CD27. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional es la radioterapia. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO). Inhibidores de IDO adecuados incluyen, sin limitación, epacadostat, F001287, indoximod y NLG919. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional es una vacuna. En determinadas realizaciones, la vacuna comprende un complejo peptídico de proteína de choque térmico (HSPPC) que comprende una proteína de choque térmico complejada con un péptido antigénico. En una realización, la proteína de choque térmico es proteína gp96 y está complejada con un péptido antigénico asociado al tumor, en donde el HSPPC se deriva de un tumor obtenido de un sujeto.
- En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo de la presente invención, a un polinucleótido de la invención, a un vector de la invención y/o a una célula huésped recombinante de la invención, para uso como un medicamento.
- En un aspecto, la presente divulgación
- se refiere a un anticuerpo de la presente invención, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención y/o una célula huésped recombinante de la invención, para uso como un agente de diagnóstico.
- En un aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de un anticuerpo de la presente invención, a un polinucleótido de la invención, a un vector de la invención y/o a una célula huésped recombinante de la invención, para la detección *in vitro* de CTLA-4 humana en una muestra biológica.
- En un aspecto, en esta memoria se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable para uso como un medicamento.
- En un aspecto, en esta memoria se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable para uso como un agente de diagnóstico.
- En un aspecto, en esta memoria se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria, un polinucleótido de la invención, un vector de la invención y/o una célula huésped recombinante de la invención, y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición farmacéutica es para uso como un medicamento y/o agente de diagnóstico.
- En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención, para uso en un método para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno.
- En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención, para uso en un método para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno en un sujeto.
- En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención, para uso en un método para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la invención.
- En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención, para uso en un método para el tratamiento del cáncer.
- En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención, para uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto.
- En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención, para uso en un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la invención.
- En un aspecto, la presente divulgación se refiere a (a) un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional, preferiblemente un anticuerpo anti-PD- 1, para uso como un medicamento.
- En un aspecto, la presente divulgación se refiere a (a) un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional, preferentemente un anticuerpo anti-PD- 1, para uso en un método para el tratamiento del cáncer. En una realización

preferida, el cáncer es un tumor sólido. En otro aspecto preferido, el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención se administra al sujeto por vía intratumoral, preferiblemente se administra por vía intratumoral al sujeto a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg, opcionalmente en un intervalo de una vez cada tres semanas.

- 5 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica, kit o kit de partes que comprende (a) un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional, preferiblemente un anticuerpo anti-PD-1.

- 10 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a (a) un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un anticuerpo anti-EGFR y, opcionalmente, (c) un agente quimioterapéutico, para uso como un medicamento.

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

- 20 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica, kit o kit de partes que comprende (a) un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un anticuerpo anti-EGFR y, opcionalmente, (c) un agente quimioterapéutico.

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

- 25 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a (a) un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un anticuerpo anti-HER2 y, opcionalmente, (c) un agente quimioterapéutico para uso en un método para el tratamiento del cáncer de mama HER2+. En otro aspecto preferido, el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía intratumoral al sujeto, preferiblemente se administra por vía intratumoral al sujeto a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg, opcionalmente en un intervalo de una vez cada tres semanas.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica, kit o kit de partes que comprende (a) un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un anticuerpo anti-HER2 y, opcionalmente, (c) un agente quimioterapéutico.

- 35 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención, para uso en un método para el tratamiento del cáncer, en donde el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención se administran por vía intratumoral al sujeto, preferiblemente se administra por vía intratumoral al sujeto a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, o 3 mg/kg, opcionalmente a intervalos de una vez cada tres semanas.

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

- 45 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a (a) un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional, para uso como un medicamento. En una realización preferida, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente que fija como objetivo un punto de control o un inhibidor de indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) o una vacuna.

- 50 En un aspecto, la presente divulgación se refiere a (a) un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional, para uso como un medicamento para el tratamiento del cáncer. En una realización preferida, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente que fija como objetivo un punto de control o un inhibidor de indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) o una vacuna.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica, kit o kit de partes que comprende (a) un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un agente terapéutico adicional. En una realización preferida, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente que fija como objetivo un punto de control o un inhibidor de indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) o una vacuna.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención, para uso en un método para el tratamiento del cáncer, en donde el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención se suministran a un ganglio linfático que drena el tumor.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención en un método para el tratamiento del cáncer, y/o en un método para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno en un sujeto, en donde el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención se suministra a un ganglio linfático que drena el tumor.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención, para preparar medicamentos para la inmunoterapia, por ejemplo, para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno en un sujeto, tratar el cáncer o tratar o prevenir enfermedades infecciosas.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención, para preparar medicamentos para la inmunoterapia, por ejemplo, para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno en un sujeto, tratar el cáncer o tratar o prevenir enfermedades infecciosas, en donde el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención se administra a un ganglio linfático que drena el tumor.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de (a) un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un anticuerpo anti-HER2 y, opcionalmente, (c) un agente quimioterapéutico, para preparar un medicamento para inmunoterapia, por ejemplo, para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno en un sujeto, tratar el cáncer o tratar o prevenir enfermedades infecciosas.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere al uso de (a) un anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o composición farmacéutica de la presente invención y (b) un anticuerpo anti-HER2 y, opcionalmente, (c) un agente quimioterapéutico, para preparar un medicamento para inmunoterapia, por ejemplo, para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno en un sujeto, tratar el cáncer o tratar o prevenir enfermedades infecciosas, en donde el anticuerpo, polinucleótido, vector, célula huésped recombinante y/o la composición farmacéutica de la presente invención se suministra a un ganglio linfático que drena el tumor.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1A** es una tabla que muestra las afinidades de unión (K_D) del anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884 y un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia a CTLA-4 dimérica y monomérica recombinante humana, de cynomolgus, ratón y la rata, según se mide por resonancia de plasmón de superficie. La **Figura 1B** es un gráfico que muestra la unión de AGEN1884w, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y un control de isotipo IgG₁ a células que expresan CTLA-4, según se mide por citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se calculó y se representó frente a un intervalo de concentraciones de anticuerpos. Las **Figuras 1C y 1D** muestran la selectividad de AGEN1884 y un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia que se une a CTLA-4 recombinante humana (rh) y de cynomolgus (rc), en comparación con miembros de la familia relacionados (CD28, ICOS, BTLA, y PD-1 humana recombinante, y PD-1 de cynomolgus recombinante), mostrada con relación a un anticuerpo IgG₁ control del isotipo. La unión se midió mediante tecnología de matriz de suspensión y la intensidad de fluorescencia media (MFI) a tres concentraciones de anticuerpo diferentes (10, 100 y 1000 ng/ml) se muestra en la Figura 1C. La Figura 1D es una tabla resumen de la afinidad de unión relativa basada en los datos mostrados en la Figura 1C.

La **Figura 2A** muestra la unión de AGEN1884w, un anticuerpo anti-CTLA-4 de referencia y un anticuerpo de control del isotipo IgG₁ a células T CD4⁺ humanas primarias activadas. En resumen, células T CD4⁺ recién aisladas se estimularon utilizando anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 unidos a placa durante cinco días antes del análisis de unión de anticuerpos mediante citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se calculó en un intervalo de concentraciones de anticuerpos. La **Figura 2B** muestra la unión intracelular de AGEN1884 y un anticuerpo anti-CTLA-4 de referencia en comparación con un anticuerpo de control de isotipo IgG₁ a través de una titulación de concentraciones utilizando células T CD8⁺ de cynomolgus primarias activadas (anti-CD3 y anti-CD28 con IL-2 recombinante durante tres días). Los datos se generaron por citometría de flujo y se muestran como el porcentaje de células T CTLA-4⁺ como una proporción de la población total de células T CD8⁺. La **Figura 2C** muestra los resultados

de un análisis por citometría de flujo que testa la unión de AGEN1884w y un anticuerpo de control del isotipo IgG₁ a células T CD4⁺ humanas, de cynomolgus, ratas o ratones estimuladas con fitohemaglutinina.

La **Figura 3A** es un esquema del ensayo de bloqueo de ligando utilizando tecnología de matriz de suspensión. Las **Figuras 3B y 3C** muestran el porcentaje de proteínas CD80-Fc recombinantes (Figura 3B) y CD86-Fc (Figura 3C) que se unen a perlas conjugadas con CTLA-4 en ausencia (100%) o en presencia de una titulación de dosis de AGEN1884, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia, o un anticuerpo (IgG₁) de control del isotipo. La **Figura 3D** muestra el porcentaje de CD80-Fc recombinante y CD86-Fc de unión a células T que expresan CTLA-4 (Jurkat) en presencia de concentraciones crecientes de AGEN1884w, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia, o un anticuerpo de control del isotipo (IgG₁). La **Figura 3E** muestra los resultados de un ensayo en el que células T que expresan CTLA-4 (Jurkat) se incubaron con una dosis titulada de CD80-Fc o CD86-Fc antes de una concentración fija de AGEN1884w conjugado directamente con fluorocromo o se añadió un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se calculó y se representó frente a un intervalo de concentraciones de CD80-Fc o CD86-Fc.

La **Figura 4A** representa la actividad funcional de anticuerpos anti-CTLA-4 en cultivos de PBMC humanas primarias tras la estimulación con Enterotoxina A de Staphylococcus (SEA). Específicamente, la Figura 4A muestra el cambio múltiplo en la producción de IL-2 en respuesta a una dosis-respuesta de AGEN1884w y un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia, en comparación con un control del isotipo IgG₁. Las barras de error representan la desviación estándar de los pocillos por triplicado. Las **Figuras 4B y 4C** son resultados de un ensayo informador de IL-2-luciferasa que muestra que el bloqueo de CTLA-4 conduce a la activación de células T. Una línea de células T humanas que co-expresa CD3 y CD28 (Jurkat), modificada para expresar constitutivamente CTLA-4 de la superficie celular además de un gen informador de luciferasa bajo el control de un promotor de IL-2, se co-cultivó con una línea celular presentadora de antígeno (Raji) que expresaba CD80 y CD86. La Figura 4B es un par de histogramas que muestran la expresión de CD80 y CD86 en células Raji, según se mide por citometría de flujo. La señalización de TCR se activó utilizando un anticuerpo anti-CD3 en presencia de concentraciones crecientes de AGEN1884w o un anticuerpo de control del isotipo IgG₁. La Figura 4C muestra un aumento múltiplo de la expresión de luciferasa, un marcador sustituto para la activación del gen IL-2, en respuesta a concentraciones crecientes de AGEN1884w en relación con el anticuerpo de control del isotipo. Las **Figuras 4D y 4E** son resultados de un ensayo que testa la capacidad del anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884w para disminuir la producción de IFN γ de células T CD8⁺ primarias en presencia de altas concentraciones de anticuerpo anti-CD3. Células T humanas primarias fueron estimuladas con un anticuerpo anti-CD3 (10 μ g/ml) en presencia de concentraciones crecientes de AGEN1884w soluble (Figura 4D) o unido a placa (Figura 4E) o un anticuerpo de control del isotipo IgG₁. El porcentaje de células T CD8⁺ IFN γ ⁺ se representa frente a concentraciones de anticuerpos analizadas. La línea de puntos representa la frecuencia de células T CD8⁺ IFN γ ⁺ en ausencia de estimulación de anticuerpos anti-CD3. La **Figura 4F** es un gráfico que muestra la actividad funcional del anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884w, solo o en combinación con un anticuerpo anti-LAG-3 AGEN1746, un anticuerpo anti-PD-1 Nivolumab o un anticuerpo anti-PD-1 Pembrolizumab, en cultivos de PBMC humanas primarias tras estimulación con Enterotoxina A de Staphylococcus (SEA). Se muestran la desviación media y estándar de la concentración de IL-2. IC representa control del isotipo.

La **Figura 5A** muestra las afinidades de unión (K_D) de AGEN2041w, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y un anticuerpo IgG₂ anti-CTLA-4 de referencia para CTLA-4 humana recombinante dimérica y monomérica y CTLA-4 de cynomolgus medidas por resonancia de plasmón de superficie. La **Figura 5B** es un gráfico que muestra la unión de AGEN2041w, un anticuerpo IgG₂ anti-CTLA-4 de referencia y un control del isotipo IgG₂ a células que expresan CTLA-4 según se mide en un análisis de citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se calculó y se representó frente a diferentes concentraciones de anticuerpos testadas. La **Figura 5C** es un gráfico que muestra el porcentaje de unión de CD80 y CD86 a CTLA-4 en presencia de concentraciones crecientes de AGEN2041w o un anticuerpo IgG₂ anti-CTLA-4 de referencia (12, 37, 111, 333, 1000, 3000 y 9000 ng/ml antes de añadir perlas) según se mide por la tecnología de matriz de suspensión. Las **Figuras 5D y 5E** son tablas similares a las mostradas en las Figuras 1C y 1D, respectivamente, en las que la selectividad de AGEN2041w y un anticuerpo IgG₂ anti-CTLA-4 de referencia se une a CTLA-4 humana recombinante (rh) y de cynomolgus recombinante (rc), en comparación con miembros de la familia relacionados (CD28, ICOS, BTLA y PD-1 humana recombinante; y PD-1 de cynomolgus recombinante), se testó con relación a un anticuerpo de control del isotipo IgG₂. La Figura 5D muestra valores de MFI medidos por la tecnología de matriz de suspensión y la Figura 5E es una tabla resumen basada en los datos mostrados en la Figura 5D.

La **Figura 6A** representa la actividad funcional de anticuerpos anti-CTLA-4 en cultivos de PBMC humanas primarias tras la estimulación con Enterotoxina A de Staphylococcus (SEA). La Figura 6A muestra el cambio múltiplo en la producción de IL-2 en respuesta a una dosis-respuesta de AGEN1884w y AGEN2041w, en comparación con anticuerpos de control del isotipo IgG₁ e IgG₂. Las barras de errores representan la desviación estándar de los pocillos por triplicado. La **Figura 6B** es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de informador de IL-2-luciferasa que testa AGEN2041w y un anticuerpo de control del isotipo IgG₂. El aumento múltiplo de la expresión de luciferasa, un marcador sustituto para la activación del gen IL-2, se muestra para aumentar las dosis de AGEN2041w y el anticuerpo de control del isotipo.

La **Figura 7A** es un gráfico que muestra la unión de AGEN1884w-105 (AGEN1884w producida por un clon 105 estable), un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y un control del isotipo IgG₁ a células que expresan CTLA-4 según se

medida en un análisis de citometría de flujo. Se calculó la intensidad de fluorescencia media (MFI) y se representó frente a una titulación de anticuerpos. La **Figura 7B** es el resultado de un ensayo que examina la producción de IL-2 potenciada por AGEN1884w-105, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y un control del isotipo IgG₁ después de la estimulación con Enterotoxina A de Staphylococcus (SEA). En la Figura 7B se muestran seis réplicas biológicas y valores medios (barra) de cambio múltiplo de IL-2.

Las **Figuras 8A, 8B, y 8C** son curvas de unión de una titulación de la dosis de anticuerpos a células CHO que expresan FcγRIIA^{H131} (Figura 8A), FcγRIIB (Figura 8B) y FcγRIIIA^{V158} (Figura 8C), respectivamente. Se representa la intensidad de fluorescencia media (MFI) del anticuerpo de detección secundario. Las barras de errores representan la desviación estándar de los triplicados. Los anticuerpos testados fueron AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO, AGEN2041w, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y un anticuerpo de control del isotipo IgG₁.

Las **Figuras 9A y 9B** son gráficos que muestran la respuesta media (unidades de respuesta, RU) de muestras por triplicado en un intervalo de concentraciones de AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO, AGEN2041w, y un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia unido a FcγRIIA (Figura 9A) humano o FcγRIIIA humano (Figura 9B) según se determina por resonancia de plasmón de superficie.

La **Figura 10A** es un esquema de un ensayo informador de gen del receptor de Fc gamma IIIA (FcγRIIIA). Las **Figuras 10B-10G** son resultados de un ensayo informador en el que se comparó la capacidad de AGEN1884w-105 o AGEN1884w (AGEN1884w-105 en las Figuras 10B, 10C, 10F y 10G; AGEN1884w en las Figuras 10D y 10E) de activar una línea celular informadora que expresa la variante FcγRIIIA V158 o la variante FcγRIIIA F158 con la de un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia (Figuras 10B y 10C), AGEN2041w (Figuras 10D y 10E) y una variante AGEN1884w N297A (Figuras 10F y 10G). Las unidades de luz relativas (RLU) se representan frente a un intervalo de concentraciones de anticuerpos.

La **Figura 11** es el resultado de un ensayo informador en el que AGEN2041w, un anticuerpo IgG₂ anti-CTLA-4 de referencia y un anticuerpo de control del isotipo IgG₂ se testaron en cuanto a su capacidad de activar una línea celular informadora que expresa la variante FcγRIIA^{H131} cuando los anticuerpos estaban unidos a células diana que expresan CTLA-4. Las unidades de luz relativas (RLU) se representan frente a un intervalo de concentraciones de anticuerpos.

La **Figura 12A** es un gráfico que muestra la unión de AGEN1884w-105, una variante AGEN1884w-N297A y un control del isotipo IgG₁ a células que expresan CTLA-4, según se mide en un análisis de citometría de flujo. La intensidad de fluorescencia media (MFI) se calculó y se representó frente a diferentes concentraciones de anticuerpos testados. La **Figura 12B** es el resultado de un ensayo que examina la producción de IL-2 inducida por AGEN1884w-105, AGEN1884w-N297A, y un control del isotipo IgG₁ después de la estimulación con Enterotoxina A de Staphylococcus (SEA). En la Figura 12B, se muestran seis réplicas biológicas y valores medios (barra) de cambio múltiplo de IL-2.

Las **Figuras 13A y 13B** son resultados de un ensayo que examina el impacto del bloqueo del acoplamiento de FcR sobre la actividad antagonista de anticuerpos anti-CTLA-4. En la Figura 13A se muestran siete réplicas biológicas y valores medios (barra) de cambio múltiplo de IL-2. En la Figura 13B, se muestran siete réplicas biológicas de la producción de IL-2 (pg/ml).

La **Figura 14** es un gráfico que muestra la producción de IL-2 de PBMC humanas tras la estimulación con Enterotoxina A de Staphylococcus (SEA) en respuesta a 10 µg/ml de AGEN1884w, AGEN1884w-N297A, AGEN1884w-S267E/L328F, AGEN1884w-S239D/A330L/I332E, AGEN2041w un anticuerpo de control del isotipo IgG₁ o un anticuerpo de control de isotipo IgG₂. Los valores medios (barra) de la producción de IL-2 se muestran para cada uno de los anticuerpos testados.

La **Figura 15** es un gráfico que muestra el porcentaje de lisis de células diana en presencia de células efectoras junto con una titulación de la dosis de AGEN1884w, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia, o un anticuerpo de control del isotipo. Células Jurkat modificadas para expresar constitutivamente CTLA-4 en la superficie celular se utilizaron como células diana y las células NK92-FcγRIIIA se utilizaron como células efectoras.

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

La **Figura 17A** es un alineamiento de secuencia para CTLA-4 humana (SEQ ID NO: 77), CTLA-4 de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 84), CTLA-4 de ratón (SEQ ID NO: 85) y CTLA-4 de rata (SEQ ID NO: 86). Los puntos representan residuos idénticos a residuos humanos correspondientes. Un * (asterisco) indica posiciones que tienen un solo residuo totalmente conservado. A: (dos puntos) indica conservación entre grupos de propiedades muy similares. A . (punto) indica conservación entre grupos de propiedades débilmente similares. Las **Figuras 17B y 17C** son alineamientos de secuencia para CTLA-4 humana (SEQ ID NO: 77), CTLA-4 de mono cynomolgus (SEQ ID NO: 84), CD28 humana (SEQ ID NO: 87), ICOS humana (SEQ ID NO: 88), BTLA humana (SEQ ID NO: 89) y PD-1 humana (SEQ ID NO: 90). Las dos regiones que muestran una fuerte disminución en la absorción de deuterio cuando CTLA-4 humana se unió a AGEN1884w-Fab se subrayaron en las Figuras 17A-C: Q⁸⁰VT⁸² e Y¹³⁵PPYYLGIGNGTQ¹⁴⁹. La **Figura 17D** es un conjunto compuesto de las coordenadas de rayos X en los archivos del Banco de Datos de Proteínas 3osk y 1i81. Este análisis estructural compuesto indica una agrupación en cadena tipo margarita de los grupos CTLA-4 y B7-1.

Esto proporciona un modelo del dímero B7-1 humano junto con el dímero CTLA-4 humano que se cree que es la forma oligomérica más simple del complejo inmunitario competente de señalización. El sitio de contacto entre CTLA-4 y B7-1 incluye la región M¹³⁴YPPPY¹⁴⁰, pero no se limita a este motivo particular. La **Figura 17E** es un modelo de la unión de AGEN1884w-Fab a CTLA-4 humana. Todos los residuos de CTLA-4 enumerados en la divulgación anterior de las Figuras 17A-17E están numerados de acuerdo con SEQ ID NO: 77.

Las **Figuras 18A y 18B** son resultados de un estudio de respuesta a antígeno dependiente de células T (TDAR) en monos cynomolgus. AGEN1884w (10 mg/kg), un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia (3 mg/kg) (Figura 18A), AGEN2041w (10 mg/kg) (Figura 18B), o artículo de control (Figuras 18A y 18B) se administró *por vía* intravenosa (bolo lento) junto con vacunas HBsAg (30 µg en la pata trasera) los Días 1 y 29. Se analizaron muestras duplicadas de títulos de suero anti-HBsAg (IgG) utilizando ELISA. Los puntos de datos representan la media ± EMT en cada uno de los grupos de tratamiento.

Las **Figuras 19A y 19B** son alineamientos de secuencia de cadenas pesadas variables BADD411-2354 (SEQ ID NO: 7), BADD412-2356 (SEQ ID NO: 38), BADD412-2357 (SEQ ID NO: 39), BADD412-2358 (SEQ ID NO: 40), BADD412-2359 (SEQ ID NO: 41) y BADD412-2360 (SEQ ID NO: 42), y cadenas ligeras variables BADD412-2367 (SEQ ID NO: 43), BADD412-2376 (SEQ ID NO: 8), BADD412-2382 (SEQ ID NO: 44), BADD412-2384 (SEQ ID NO: 45), BADD412-2390 (SEQ ID NO: 46) y BADD412-2393 (SEQ ID NO: 47), respectivamente. Las CDR de cadena pesada y ligera mostradas se determinan de acuerdo con Kabat.

Las **Figuras 20A-20E** son gráficos que muestran el porcentaje de unión de CD80-PE o CD86-PE recombinante a perlas acopladas a CTLA-4 en presencia de una titulación de dosis de 19 anticuerpos anti-CTLA-4 (AGEN1884-AGEN1902) según se mide por la tecnología de matriz de suspensión.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen específicamente a CTLA-4 humana y antagonizan la función de CTLA-4, p. ej., la supresión inmune mediada por CTLA-4. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden estos anticuerpos, ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos, vectores de expresión y células huésped para producir estos anticuerpos, y métodos para tratar a un sujeto utilizando estos anticuerpos. Los anticuerpos descritos en esta memoria son particularmente útiles para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno (p. ej., un antígeno tumoral) y, por lo tanto, para tratar el cáncer, o prevenir o tratar enfermedades infecciosas en un sujeto. Los anticuerpos descritos en esta memoria también son útiles para uso en composiciones farmacéuticas para, o en la fabricación de medicamentos para tratar el cáncer, o prevenir o tratar enfermedades infecciosas.

5.1 Definiciones

Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "sobre" y "aproximadamente", cuando se utilizan para modificar un valor numérico o intervalo numérico, indican que desviaciones de 5% a 10% por encima y 5% a 10% por debajo del valor o intervalo permanecen dentro del significado previsto del valor o intervalo reseñado.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "CTLA-4" se refiere a proteína 4 asociada al linfocito T citotóxico. Secuencias de nucleótidos y de polipéptidos de CTLA-4 son bien conocidas en la técnica. En el depósito GenBank GI: 15778585 se recoge una secuencia de aminoácidos ejemplar de CTLA-4 humana y en el depósito GenBank GI: 15778586 se recoge una secuencia de aminoácidos CTLA-4 de ratón.

Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" incluyen anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos y moléculas que comprenden CDRs de anticuerpos, regiones VH o regiones VL. Ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos multiespecíficos (incluidos anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, inmunoglobulinas, anticuerpos sintéticos, anticuerpos tetraméricos que comprenden dos moléculas de cadena pesada y dos de cadena ligera, un monómero de anticuerpo de cadena ligera, un monómero de anticuerpo de cadena pesada, un par de anticuerpo de cadena pesada-anticuerpo de cadena ligera, intracuerpos, anticuerpos heteroconjugados, anticuerpos de dominio único, anticuerpos monovalentes, anticuerpos de cadena sencilla o Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos camelizados, aficuerpos, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, Fvs enlazados a disulfuro (sdFv), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) (incluyendo, p. ej., anticuerpos anti-anti-Id) y fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria se refieren a poblaciones de anticuerpos policlonales. Los anticuerpos pueden ser de cualquier tipo (p. ej., IgG, IgE, IgM, IgD, IgA o IgY), de cualquier clase (p. ej., IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ o IgA₂), o de cualquier subclase (p. ej., IgG_{2a} o IgG_{2b}), de la molécula de inmunoglobulina. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria son anticuerpos IgG, o una clase (p. ej., IgG₁ o IgG₄ humana) o subclase de los mismos. En una realización específica, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado. En otra realización específica, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano. En determinadas realizaciones, un anticuerpo descrito en esta memoria es un anticuerpo IgG₁ o IgG₂.

Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "región VH" y "región VL" se refieren a las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos sencillas, respectivamente, que comprende FR (Regiones Marco) 1, 2, 3 y 4 y regiones CDR (Regiones Determinantes de la Complementariedad) 1, 2 y 3 (véase Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. (NIH Publicación N° 91-3242, Bethesda).

- 5 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "CDR" o "región determinante de la complementariedad" significa los sitios de combinación del antígeno no contiguos que se encuentran dentro de la región variable de polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. Estas regiones particulares han sido descritas por Kabat et al., *J. Biol. Chem.* 252, 6609-6616 (1977) y Kabat et al., *Sequences of protein of immunological interest*. (1991), y por Chothia et al., *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987) y por MacCallum et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), en que las definiciones incluyen solapamiento o subconjuntos de residuos de aminoácidos cuando se comparan entre sí. Los residuos de aminoácidos que abarcan las CDR tal como se definen por cada una de las referencias arriba citadas se recogen para comparación. Preferiblemente, el término "CDR" es una CDR tal como se define por Kabat, en base a comparaciones de secuencia. CDRH1, CDRH2 y CDRH3 designan las CDR de cadena pesada, y CDRL1, CDRL2 y CDRL3 designan las CDR de cadena ligera.
- 10
- 15 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "sistema de numeración de la UE" se refiere a la convención de numeración de la UE para las regiones constantes de un anticuerpo, tal como se describe en Edelman, G.M. et al., *Proc. Natl. Acad. USA*, 63, 78-85 (1969) y Kabat et al, en "*Sequences of Proteins of Immunological Interest*", U.S. Dept. Health and Human Services, 5ª edición, 1991.

- 20 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "residuos de aminoácidos del marco (FR)" se refiere a aquellos aminoácidos en la región marco de una cadena de inmunoglobulina. La expresión "región marco" o "región FR", tal como se utiliza en esta memoria, incluye los residuos de aminoácidos que son parte de la región variable, pero no son parte de las CDR (p. ej., utilizando la definición de Kabat de CDR).

- 25 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "afucosilación" o "afucosilado" en el contexto de un Fc se refiere a una carencia sustancial de una fucosa fijada covalentemente, directa o indirectamente, al residuo 297 de la región Fc de IgG1 humana, numeradas según el índice de la UE (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)), o el residuo correspondiente en inmunoglobulinas no IgG1 o no IgG1 humana. Por lo tanto, en una composición que comprende una pluralidad de anticuerpos afucosilados, al menos el 70% de los anticuerpos no estarán fucosilados, directa o indirectamente (p. ej., mediante azúcares intermedios) en el residuo 297 de la región Fc de los anticuerpos, y en algunas realizaciones en al menos 80%, 85%, 90%, 95% o 99% no estarán fucosilados, directa o indirectamente en el residuo 297 de la región Fc.
- 30

- 35 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "se une específicamente a" se refiere a la capacidad de un anticuerpo de unirse a un antígeno con una constante de disociación (Kd) de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M, 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 1×10^{-12} M, o menos, y/o de unirse a un antígeno con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por un antígeno no específico.

- 40 Tal como se utiliza en esta memoria, un "epítipo" es un término en la técnica y se refiere a una región localizada de un antígeno al que un anticuerpo puede unirse específicamente. Un epítipo puede ser, por ejemplo, aminoácidos contiguos de un polipéptido (epítipo lineal o contiguo) o un epítipo puede, por ejemplo, proceder de dos o más regiones no contiguas de un polipéptido o polipéptidos (epítipo conformacional, no lineal, discontinuo o no contiguo).
- 45 En determinadas realizaciones, el epítipo al que se une un anticuerpo puede determinarse mediante, p. ej., espectroscopía de RMN, estudios de cristalografía de difracción de rayos X, ensayos ELISA, intercambio de hidrógeno/deuterio acoplado a espectrometría de masas (p. ej., espectrometría de masas con electroproyección de cromatografía de líquidos), ensayos de exploración de oligopéptidos basados en matrices y/o mapeo de mutagénesis (p. ej., mapeo de mutagénesis dirigida al sitio). Para la cristalografía de rayos X, la cristalización se puede lograr utilizando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (p. ej., Giegé R et al., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1-23; Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1269-1274; McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6300-6303). Cristales de anticuerpo:antígeno pueden estudiarse utilizando técnicas de difracción de rayos X bien conocidas y pueden refinarse utilizando software de computadora tal como X-PLOR (Yale University, 1992, distribuido por Molecular Simulations, Inc.; véase, p. ej., *Meth Enzymol* (1985) volúmenes 114 y 115, eds Wyckoff HW et al.; documento U.S. 2004/0014194), y BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49(Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P et al., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Se pueden realizar estudios de mapeo de mutagénesis utilizando cualquier método conocido por un experto en la técnica. Véase, p. ej., Champe M et al., (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 y Cunningham BC y Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085 para una descripción de técnicas de mutagénesis, incluidas las técnicas de mutagénesis de exploración de alanina. En una realización específica, el epítipo de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se determina utilizando estudios de mutagénesis de exploración de alanina.
- 50
- 55

- 60 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "tratar", "tratando" y "tratamiento" se refieren a medidas terapéuticas o preventivas describe en esta memoria. Los métodos de "tratamiento" emplean la administración de un anticuerpo a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno, o que está predispuesto a tener dicha enfermedad o trastorno, para

prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno o enfermedad o trastorno recurrente, o con el fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

5 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "cantidad eficaz" en el contexto de la administración de una terapia a un sujeto se refiere a la cantidad de una terapia que logra un efecto profiláctico o terapéutico deseado.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "sujeto" incluye cualquier ser humano o animal no humano.

10 El intercambio de hidrógeno-deuterio se evalúa utilizando un ensayo que comprende las siguientes etapas: (a) tomar una solución de CTLA-4 sola o CTLA-4 en combinación con un anticuerpo en tampón acuoso y diluir esta solución en un exceso de aproximadamente 90% volumen/volumen de tampón de marcaje de óxido de deuterio, p. ej., durante 0, 60, 300, 1800 y 7200 segundos; (b) enfriar bruscamente el intercambio de hidrógeno por deuterio reduciendo el pH; (c) someter las muestras a digestión con proteasas y análisis de espectrometría de masas; y (d) calcular la incorporación de deuterio en péptidos proteolíticos CTLA-4 y comparar la incorporación de deuterio en presencia o ausencia del anticuerpo. El intercambio de hidrógeno por deuterio en un péptido proteolítico CTLA-4 se "reduce" si el intercambio de hidrógeno/deuterio en presencia de un anticuerpo anti-CTLA-4 se reduce al menos en un 10% con respecto al intercambio de hidrógeno/deuterio en la ausencia del anticuerpo, según lo evaluado por el ensayo anterior.

5.2 Anticuerpos anti-CTLA-4

En un aspecto, la presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen específicamente a CTLA-4 humana y antagonizan la función de CTLA-4. Las secuencias de aminoácidos de anticuerpos ilustrativos se recogen en las Tablas 1-6 en esta memoria.

20 **Tabla 1** Secuencias de regiones variables, CDR y marcos (FR) de anticuerpos anti-CTLA-4 ilustrativos

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
1	Kabat (AGEN1884w) CDRH1	YSYMN
2	Kabat (AGEN1884w) CDRH2	SISSSSSYIYYADSVKG
3	Kabat (AGEN1884w) CDRH3	VGLMGPFDI
4	Kabat (AGEN1884w) CDRL1	RASQSVSRYL
5	Kabat (AGEN1884w) CDRL2	GASTRAT
6	Kabat (AGEN1884w) CDRL3	QQYGSSPWT
7	VH (AGEN1884w)	EVQLVESGGGLV KPGGSLRLS CAASGFTFSSYS MNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVSS
8	VL (AGEN1884w)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRYL GWYQQK GQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPED FAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
9	Secuencia de la línea germinal: IGHV3-21*01	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCAR
10	Secuencia de la línea germinal: IGKV3-20*01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYGSSP
11	Secuencia de la línea germinal: IGKV3-11*01	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPED FAVYYCQQRNWWP
12	AGEN1884w cadena pesada de longitud completa (con lisina C-terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
93	AGEN1884w cadena pesada de longitud completa (sin lisina C-terminal)	

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
13	AGEN1884w secuencia de cadena ligera de longitud completa	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRYLGWYQQKP GQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPED FAVYYCQYQGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
14	AGEN2041w secuencia de cadena pesada de longitud completa (con lisina C-terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQT YTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPVAGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSFLTIVVHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK
94	AGEN2041w secuencia de cadena pesada de longitud completa (sin lisina C-terminal)	

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
		EVQLVESGGGLVCKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSNFGTQT YTCNVDPKPSNTKVDKTVERKCCVECPPEPPVAGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSIVLVHVDWLNKG EYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP MLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKSLSLSPG
15	AGEN1884 secuencia de cadena ligera de longitud completa	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLGWYQQKP GQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFLTITRLEPED FAVYYCQYQSSPWTFGQGTKVEIKRSVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
16	IMGT (AGEN1884w) CDRH1	GFTFSSYS
17	IMGT (AGEN1884w) CDRH2	ISSSSSYI
18	IMGT (AGEN1884w) CDRH3	ARVGLMGPFDI
19	IMGT (AGEN1884w) CDRL1	QSVSRV
20	IMGT (AGEN1884w) CDRL2	GAS
21	IMGT (AGEN1884w) CDRL3	QYQSSPWTF
22	secuencia consenso de CDRH1	SYX ₁ MX ₂ , en donde
		X ₁ es S o A; y
		X ₂ es N o S
23	secuencia consenso de CDRH3	VGLMGPFXI, en donde
		X es D o N

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
24	secuencia consenso de CDRL1	RASQSVX ₁ X ₂ YLX ₃ , en donde
		X ₁ es S o G;
		X ₂ es R, S o T; y
		X ₃ es G o A
25	secuencia consenso de CDRL2	X ₁ X ₂ SX ₃ RAT, en donde
		X ₁ es G o A;
		X ₂ es A o T; y
		X ₃ es T, S, R o N
26	secuencia consenso de CDRL3	QQYGX ₁ SPX ₂ T, en donde
		X ₁ es S o T; y
		X ₂ es W o F
27	CDRH1	SYAMS
28	CDRH3	VGLMGPFNI
29	CDRL1	RASQSVSSYLA
30	CDRL1	RASQSVGTYLA
31	CDRL2	GASRRAT
32	CDRL2	ATSSRAT
33	CDRL2	GASSRAT
34	CDRL2	AASTRAT
35	CDRL2	GASNRAT
36	CDRL3	QQYGTSPWT
37	CDRL3	QQYGSSPFT
38	VH	EVQLLES GGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLVWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDN AKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTS S

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
39	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS
40	VH	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS
41	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLVWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFNIWGQGTMTVTVS S
42	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS
43	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGTYLAWYQHKV GQAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQYQGSPWTFGQGTKVEIK
44	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPSLLIYATSSRATGIPDRFSGSVSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQYGTSPWTFGQGTKVEIK
45	VL	EIVLTQSPATLSFSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTFTISRLEPED FAVYYCQYQGSPFTFGPGTKVDIK

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
46	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYAASTRATGIPDRFSGSASGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
47	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPED FAVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIK
48	VH FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
49	VH FR2	WVRQAPGKGLEWVS
50	VH FR3	RFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
51	VH FR4	WGQGTMTVSS
52	VH FR1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
53	VH FR2	WVRQAPGKGLVWVS
54	VH FR3	RFTISRDNANKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAR
55	VH FR1	EVQLLES GGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
56	VH FR1	EVQLVES GGGLVQPGGSLTLSCAASGFTFS
57	VL FR1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC
58	VL FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
59	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYC
60	VL FR4	FGQGTKVEIK
61	VL FR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
62	VL FR2	WYQHKVGQAPRLLIY
63	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
64	VL FR2	WYQQKPGQAPSLLIY

ES 2 803 655 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
65	VL FR3	GIPDRFSGSVSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
66	VL FR1	EIVLTQSPATLSFSPGERATLSC
67	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTFTISRLEPEDFAVYYC
68	VL FR4	FGPGTKVDIK
69	VL FR1	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSC
70	VL FR3	GIPDRFSGSASGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
71	VL FR3	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYC
72	secuencia consenso de VH	EVQLX ₁ ESGGGLVX ₂ PGGSLX ₃ LSCAASGFTFSSYX ₄ MX ₅ W VRQAPGKGLX ₆ WVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNK NX ₇ LYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFX ₈ IWGQGT MVTVSS, en donde
		X ₁ es V o L;
		X ₂ es K o Q;
		X ₃ es R o T;
		X ₄ es S o A;
		X ₅ es N o S;
		X ₆ es E o V;
		X ₇ es S o T; y
		X ₈ es D o N
73	secuencia consenso de VL	EIVLTQSPX ₁ TLX ₂ SPGERATLSCRASQSVX ₃ X ₄ YLX ₅ WYQ X ₆ KX ₇ GQAPX ₈ LLIYXgX ₁₀ SX ₁₁ RATGIPX ₁₂ RFSGSX ₁₃ SGTDF TX ₁₄ TIX ₁₅ X ₁₆ LEPEDFAVYYCQQYGX ₁₇ SPX ₁₈ TFGX ₁₉ GTKV X ₂₀ IK, en donde
		X ₁ es G o A;
		X ₂ es L, V o F;
		X ₃ es S o G;
		X ₄ es R, T o S;
		X ₅ es G o A;
		X ₆ es Q o H;
		X ₇ es P o V;

ES 2 803 655 T3

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
		X ₈ es R o S;
		X ₉ es G o A;
		X ₁₀ es A o T;
		X ₁₁ es T, R, S o N;
		X ₁₂ es D o A;
		X ₁₃ es G, V o A;
		X ₁₄ es L o F;
		X ₁₅ es T o S;
		X ₁₆ es R o S;
		X ₁₇ es S o T;
		X ₁₈ es W o F;
		X ₁₉ es Q o P; y
		X ₂₀ es E o D
74	AGEN1884w N297A cadena pesada de longitud completa (con lisina C-terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGMVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
95	AGEN1884w N297A cadena pesada de longitud completa (sin lisina C-terminal)	

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
		EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
75	AGEN1884w S267E/L328F cadena pesada de longitud completa (con lisina C- terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVEHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKAFPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
96	AGEN1884w S267E/L328F cadena pesada de longitud completa (sin lisina C- terminal)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVEHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKAFPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPG
76	AGEN1884w S239D/A330L/I33 2E cadena pesada de longitud completa (con lisina C-terminal)	

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
		EVQLVESGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
97	AGEN1884w S239D/A330L/I33 cadena pesada longitud completa lisina C-terminal) 2E de (sin	EVQLVESGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQ APGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLY LQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPG

Tabla 2. Secuencias de CDR de cadena pesada de anticuerpos anti-CTLA-4 ilustrativos ¹

Anticuerpo	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
AGEN1884w	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1885	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1886	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1887	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1888	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1889	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1890	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1891	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)

Anticuerpo	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
AGEN1892	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1893	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1894	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1895	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1896	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1897	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1898	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1899	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1900	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1901	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1902	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
¹ Las CDR de VH en la Tabla 2 se determinan de acuerdo con Kabat.			

Tabla 3. Secuencias de CDR de cadena ligera de anticuerpos anti-CTLA-4 ilustrativos ²

Anticuerpo	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
AGEN1884w	RASQSVSRYL (4)	GASTRAT (5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1885	RASQSVSSYLA (29)	ATSSRAT (32)	QQYGTSPWT (36)
AGEN1886	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1887	RASQSVSRYL (4)	GASTRAT (5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1888	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1889	RASQSVGTYLA (30)	GASRRAT (31)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1890	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1891	RASQSVSSYLA (29)	AASTRAT (34)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1892	RASQSVSSYLA (29)	GASNRAT (35)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1893	RASQSVGTYLA (30)	GASRRAT (31)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1894	RASQSVSRYL (4)	GASTRAT (5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1895	RASQSVSSYLA (29)	ATSSRAT (32)	QQYGTSPWT (36)

Anticuerpo	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
AGEN1896	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1897	RASQSVSRYL (4)	GASTRAT (5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1898	RASQSVSSYLA (29)	ATSSRAT (32)	QQYGTSPWT (36)
AGEN1899	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1900	RASQSVSSYLA (29)	GASNRAT (35)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1901	RASQSVGTYLA (30)	GASRRAT (31)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1902	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT (33)	QQYGSSPFT (37)
² Las CDR de VL en la Tabla 3 se determinan de acuerdo con Kabat.			

Tabla 4. Secuencias de marco (FR) de VH de anticuerpos anti-CTLA-4 ilustrativos ³

Anticuerpo	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN1884w	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1885	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1886	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1887	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKG LVWVS (53)	RFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1888	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKG LVWVS (53)	RFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)

ES 2 803 655 T3

Anticuerpo	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN1889	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1890	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1891	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1892	EVQLVESGGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1893	EVQLLES GGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (55)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1894	EVQLLES GGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (55)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1895	EVQLLES GGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (55)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1896	EVQLLES GGGLVKPGGSLR LSCAASGFTFS (55)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)

Anticuerpo	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN1897	EVQLLES GGGLVQP GGSLR LSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKG LVWVS (53)	RFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1898	EVQLLES GGGLVQP GGSLR LSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKG LVWVS (53)	RFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1899	EVQLLES GGGLVQP GGSLR LSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKG LVWVS (53)	RFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1900	EVQLLES GGGLVQP GGSLR LSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKG LVWVS (53)	RFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1901	EVQLVES GGGLVQP GGSLT LSCAASGFTFS (56)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)
AGEN1902	EVQLVES GGGLVQP GGSLT LSCAASGFTFS (56)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDN AKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVT VSS (51)

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

Tabla 5. Secuencias de marco (FR) de VL de anticuerpos anti-CTLA-4 ilustrativos ⁴

Anticuerpo	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN1884w	EIVLTQSPGTLSSLSPG ERATLSC (57)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTI TRLEPEDFAVYYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1885	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSC (61)	WYQQKPGQA PSLLIY (64)	GIPDRFSGSVSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1886	EIVLTQSPATLSFSPG ERATLSC (66)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFTIS RLEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1887	EIVLTQSPGTLSSLSPG ERATLSC (57)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTI TRLEPEDFAVYYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1888	EIVLTQSPATLSFSPG ERATLSC (66)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFTIS RLEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1889	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSC (61)	WYQHKVGQA PRLLIY (62)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1890	EIVLTQSPATLSFSPG ERATLSC (66)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFTIS RLEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1891	EIVLTQSPATLSVSP GERATLSC (69)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSASGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYC (70)	FGQGTKVEIK (60)

ES 2 803 655 T3

Anticuerpo	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN1892	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSC (61)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYC (71)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1893	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSC (61)	WYQHKVGQA PRLLIY (62)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1894	EIVLTQSPGTLSSLSPG ERATLSC (57)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTI TRLEPEDFAVYYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1895	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSC (61)	WYQQKPGQA PSLLIY (64)	GIPDRFSGSVSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1896	EIVLTQSPATLSFSPG ERATLSC (66)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFTIS RLEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1897	EIVLTQSPGTLSSLSPG ERATLSC (57)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTI TRLEPEDFAVYYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1898	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSC (61)	WYQQKPGQA PSLLIY (64)	GIPDRFSGSVSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1899	EIVLTQSPATLSFSPG ERATLSC (66)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFTIS RLEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)

Anticuerpo	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN1900	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSC (61)	WYQQKPGQA PRLIY (58)	GIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYC (71)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1901	EIVLTQSPATLSLSPG ERATLSC (61)	WYQHKVGQA PRLIY (62)	GIPDRFSGSGSGTDFTLTI SRLEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1902	EIVLTQSPATLSFSPG ERATLSC (66)	WYQQKPGQA PRLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFFTIS RLEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)

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

Tabla 6. Secuencias de VH y VL de anticuerpos anti-CTLA-4 ilustrativos

Anticuerpo	Región variable de la cadena pesada	SEQ ID NO:	Región variable de la cadena ligera	SEQ ID NO:
AGEN1884w	BADD411-2354	7	BADD412-2376	8
AGEN1885	BADD411-2354	7	BADD412-2382	44
AGEN1886	BADD411-2354	7	BADD412-2384	45
AGEN1887	BADD412-2356	38	BADD412-2376	8
AGEN1888	BADD412-2356	38	BADD412-2384	45
AGEN1889	BADD412-2357	39	BADD412-2367	43
AGEN1890	BADD412-2357	39	BADD412-2384	45
AGEN1891	BADD412-2357	39	BADD412-2390	46
AGEN1892	BADD412-2357	39	BADD412-2393	47
AGEN1893	BADD412-2358	40	BADD412-2367	43

Anticuerpo	Región variable de la cadena pesada	SEQ ID NO:	Región variable de la cadena ligera	SEQ ID NO:
AGEN1894	BADD412-2358	40	BADD412-2376	8
AGEN1895	BADD412-2358	40	BADD412-2382	44
AGEN1896	BADD412-2358	40	BADD412-2384	45
AGEN1897	BADD412-2359	41	BADD412-2376	8
AGEN1898	BADD412-2359	41	BADD412-2382	44
AGEN1899	BADD412-2359	41	BADD412-2384	45
AGEN1900	BADD412-2359	41	BADD412-2393	47
AGEN1901	BADD412-2360	42	BADD412-2367	43
AGEN1902	BADD412-2360	42	BADD412-2384	45

Tabla 7. Secuencias ilustrativas de CTLA-4 y miembros de la familia

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
77	CTLA-4 (P16410) humana	MACLGFQRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMH VAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLQAD SQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTQ GLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPC PDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLTAVSLSKMLKKRSPLTT GVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN
78	epítipo de CTLA-4	QVT
79	epítipo de CTLA-4	YPPPYLIGINGTQI
80	epítipo de CTLA-4	YLG I
81	epítipo de CTLA-4	MYPPPY
82	epítipo de CTLA-4	YPPPYLGI
83	epítipo de CTLA-4	YLGINGTQI

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
84	CTLA-4 (G7PL88)	MACLGFQRHKARLNLATRTRPYTLLFSLLFIPVFASKAMHV AQPAVVLANSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQG LRAMDTGLYICKVELMYPPPYMGIGNGTQIYVIDPEPCP DSDFLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTT GVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN
85	CTLA-4 (P09793) de ratón	MACLGLRRYKAQLQLPSRTWPFVALLTLLFIPVFSEAIQV TQPSVVLASSHGVASFPCEYSPSHNTDEVRTVLRQTNDQ MTEVCATTFTTEKNTVGFLDYPFCSGTFNESRVNLTIQGLR AVDTGLYLCKVELMYPPPYFVGMGNGTQIYVIDPEPCPD SDFLWILVAVSLGLFFYSFLVSAVSLSKMLKKRSPLTTG VYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN
86	CTLA-4 (Q62859) de rata	MACLGLQRYKTHLQLPSRTWPFVLLSLLFIPIFSEAIQVT QPSVVLASSHGVASFPCEYASSHNTDEVRTVLRQTNDQ VTEVCATTFTVKNTLGFLDDPFCSGTFNESRVNLTIQGLR AADTGLYFCKVELMYPPPYFVGMGNGTQIYVIDPEPCPD DFLLWILAAVSSGLFFYSFLVTAVSLNRTLKKRSPLTTGV YVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN
87	CD28 (P10747) humana	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLS CKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVYGNYSQQQLQV YSKTGFNC DGKLGNESVT FYLQNLVYNQTDIYFCKIEVM YPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLV VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPR RPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
88	ICOS (Q9Y6W8) humana	MKSGLWYFFLFCLRIKVL TGEINGSANYEMFIFHNGGVQI LCKYPDIVQQFKMQLLKGGQILCDLTKTKGSGNTVSIKSL KFCHS QLSNNSVSFFLYNLDHSHANYFYCNLSIFDPPPFKV TLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVCILGCILIC WLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL
89	BTLA (Q7Z6A9) humana	

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
		MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNHKGESCDVQLYI KRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCKLNGTTC VKLEDQRQTSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANF QSNLIESHSTTLVYTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYRLL PLGGLPLLITTCFCLFCCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVD AHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMEQEGS EVYSNPCLEENKPGIVYASLNHNVIGPNSRLARNVKEAPT EYASICVRS
90	PD-1 (Q15116) humana	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFS PALLVVTEGDNATFTCSFSNTSEFVLNWMSPSNQTD KLAAPEDRSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVRARRN DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHP PSPRPAGQFQTLVVGTVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRRA RGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSDYGELDFQWREKTPE PPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPL RPEDGHCSWPL

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende:

- 5 (a) una CDRH1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SYX₁MX₂ (SEQ ID NO: 22), en donde X₁ es S o A; y X₂ es N o S; y/o
- (b) una CDRH2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SSSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 2); y/o
- (c) una CDRH3 que comprende la secuencia de aminoácidos de VGLMGPFXI (SEQ ID NO: 23), en donde X es D o N; y/o
- (d) una CDRL1 que comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID NO: 24), en donde X₁ es S o G; X₂ es R, S o T; y X₃ es G o A; y/o
- 10 (e) una CDRL2 que comprende la secuencia de aminoácidos de X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID NO: 25), en donde X₁ es G o A; X₂ es A o T; y X₃ es T, S, R o N; y/o
- (f) una CDRL3 que comprende la secuencia de aminoácidos de QQYGX₁SPX₂T (SEQ ID NO: 26), en donde X₁ es S o T; y X₂ es W o F.

- 15 En determinados aspectos, el anticuerpo comprende una, dos, o los tres de las CDR de VH anteriores. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende la CDRH1 de uno de los anticuerpos en la Tabla 2. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende la CDRH2 de uno de los anticuerpos en la Tabla 2. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende la CDRH3 de uno de los anticuerpos en la Tabla 2. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende una, dos o las tres CDR de VH de uno de los anticuerpos en la Tabla 2 (*p. ej.*, las CDR de VH en una fila de la Tabla 2, por ejemplo, todas las CDR de VH son del anticuerpo AGEN1884w). En determinados aspectos, el anticuerpo comprende los marcos VH descritos en esta memoria. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende las regiones marco de VH de un anticuerpo recogido en la Tabla 4 (*p. ej.*, una, dos, tres o cuatro de las regiones marco en una fila de la Tabla 4).
- 20

- 25 En determinados aspectos, el anticuerpo comprende una, dos o las tres de las CDR de VL anteriores. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende la CDRL1 de uno de los anticuerpos en la Tabla 3. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende la CDRL2 de uno de los anticuerpos en la Tabla 3. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende la CDRL3 de uno de los anticuerpos en la Tabla 3. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende una, dos o las tres CDR de VL de uno de los anticuerpos en la Tabla 3 (*p. ej.*, las CDR de VL en una fila de la Tabla 3, por ejemplo, todas las CDR de VL son del anticuerpo AGEN1884w). En determinados aspectos, el anticuerpo comprende las regiones marco de VL descritas en esta memoria. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende

las regiones marco (FR) de VL de un anticuerpo recogido en la Tabla 5 (*p. ej.*, una, dos, tres o cuatro de las regiones marco en una fila de la Tabla 5).

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad CDRH1, CDRH2 y CDRH3 y una región variable de la cadena ligera que comprende regiones determinantes de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde:

(a) CDRH1 comprende la secuencia de aminoácidos de SYX₁MX₂ (SEQ ID NO: 22), en donde X₁ es S o A; y X₂ es N o S;

(b) CDRH2 comprende la secuencia de aminoácidos de SISSSSSYIYYADSVKG (SEQ ID NO: 2);

(c) CDRH3 comprende la secuencia de aminoácidos de VGLMGPFXI (SEQ ID NO: 23), en donde X es D o N;

(d) CDRL1 comprende la secuencia de aminoácidos de RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID NO: 24), en donde X₁ es S o G; X₂ es R, S o T; y X₃ es G o A;

(e) CDRL2 comprende la secuencia de aminoácidos de X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID NO: 25), en donde X₁ es G o A; X₂ es A o T; y X₃ es T, S, R o N; y

(f) CDRL3 comprende la secuencia de aminoácidos de QQYGX₁SPX₂T (SEQ ID NO: 26), en donde X₁ es S o T; y X₂ es W o F.

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

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, en donde las CDRH1, CDRH2 y CDRH3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente, recogidas en SEQ ID NO: 1, 2 y 3; 27, 2 y 3; o 27, 2 y 28.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende regiones determinantes de la complementariedad de CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde las CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente, recogidas en SEQ ID NO: 4, 5 y 6; 29, 32 y 36; 29, 33 y 37; 30, 31 y 6; 29, 34 y 6; o 29, 35 y 37.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad de CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de la cadena ligera que comprende regiones determinantes de la complementariedad CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente, recogidas en las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6; 1, 2, 3, 29, 32 y 36; 1, 2, 3, 29, 33 y 37; 27, 2, 3, 4, 5 y 6; 27, 2, 3, 29, 33 y 37; 1, 2, 3, 30, 31 y 6; 1, 2, 3, 29, 34 y 6; 1, 2, 3, 29, 35 y 37; 27, 2, 28, 4, 5 y 6; 27, 2, 28, 29, 32 y 36; 27, 2, 28, 29, 33 y 37; o, 27, 2, 28, 29, 35 y 37, respectivamente.

La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. El anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos establecidas en SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

En determinados aspectos, las CDR de un anticuerpo se pueden determinar de acuerdo con el esquema de numeración de Chothia, que se refiere a la ubicación de bucles estructurales de inmunoglobulina (véase, *p. ej.*, Chothia C y Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B et al., (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C et al.,

(1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A et al., (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; y Patente de EE.UU. No 7.709.226). Típicamente, cuando se utiliza la convención de numeración de Kabat, el bucle de CDRH1 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena pesada 26 a 32, 33 o 34, el bucle de CDRH2 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena pesada 52 a 56 y el bucle de CDRH3 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena pesada 95 a 102, mientras que el bucle de CDRL1 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena ligera 24 a 34, el bucle de CDRL2 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena ligera 50 a 56 y el bucle de CDRL3 de Chothia está presente en los aminoácidos de cadena ligera 89 a 97. El extremo del bucle de CDRH1 de Chothia, cuando se numera utilizando la convención de numeración de Kabat, varía entre H32 y H34 dependiendo de la longitud del bucle (esto se debe a que el esquema de numeración de Kabat coloca las inserciones en H35A y H35B; si ni 35A ni 35B están presentes, el bucle termina en 32; si solo está presente 35A, el bucle termina en 33; si están presentes tanto 35A como 35B, el bucle termina en 34).

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, comprendiendo el anticuerpo las CDR de VL de Chothia de una VL de un anticuerpo descrito en la Tabla 6 en esta memoria (p. ej., AGEN1884w o AGEN2041w). En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, comprendiendo el anticuerpo las CDR de VH de Chothia de un anticuerpo descrito en la Tabla 6 en esta memoria (p. ej., AGEN1884w o AGEN2041w). En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, comprendiendo el anticuerpo las CDR de VH de Chothia y las CDR de VL de Chothia de un anticuerpo descrito en la Tabla 6 en esta memoria (p. ej., AGEN1884w o AGEN2041w). En determinados aspectos, los anticuerpos que se unen específicamente a la proteína CTLA-4 humana comprenden una o más CDR, en las que las CDR de Chothia y Kabat tienen la misma secuencia de aminoácidos. En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana y comprende combinaciones de CDR de Kabat y CDR de Chothia.

En determinados aspectos, las CDR de un anticuerpo se pueden determinar de acuerdo con el sistema de numeración IMGT tal como se describe en Lefranc M-P, (1999) The Immunologist 7: 132-136 y Lefranc M-P et al., (1999) Nucleic Acids Res 27: 209-212. De acuerdo con el esquema de numeración IMGT, CDRH1 está en las posiciones 26 a 35, CDRH2 está en las posiciones 51 a 57, CDRH3 está en las posiciones 93 a 102, CDRL1 está en las posiciones 27 a 32, CDRL2 está en las posiciones 50 a 52 y CDRL3 está en las posiciones 89 a 97. En una realización particular, la presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen específicamente a la proteína CTLA-4 humana y comprenden CDR de un anticuerpo descrito en la Tabla 6 de esta memoria (por ejemplo, AGEN1884w o AGEN2041w) según se determina por el sistema de numeración IMGT, por ejemplo, tal como se describe en Lefranc M-P (1999) *supra* y Lefranc M-P et al., (1999) *supra*.

En determinados aspectos, las CDR de un anticuerpo se pueden determinar de acuerdo con MacCallum RM et al., (1996) J Mol Biol 262: 732-745. Véase también, p. ej., Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," en Antibody Engineering, Kontermann y Dübel, eds., Capítulo 31, págs. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001). En una realización particular, la presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen específicamente a la proteína CTLA-4 humana y comprenden CDR de un anticuerpo descrito en la Tabla 6 en esta memoria (p. ej., AGEN1884w o AGEN2041w) según se determina por el método en MacCallum RM et al.

En determinados aspectos, las CDR de un anticuerpo se pueden determinar de acuerdo con el esquema de numeración AbM, que se refiere a regiones hipervariables AbM, que representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizados por el software de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.). En una realización particular, la presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen específicamente a la proteína CTLA-4 humana y comprenden CDR de un anticuerpo descrito en la Tabla 6 en esta memoria (p. ej., AGEN1884w o AGEN2041w) según se determina por el esquema de numeración AbM.

Por consiguiente, en determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de la región CDRH1, CDRH2 y CDRH3 recogidas en SEQ ID NO: 7, y las secuencias de aminoácidos de la región CDRL1, CDRL2 y CDRL3 recogidas en SEQ ID NO: 8, en donde cada una de las CDR se define de acuerdo con la definición de Kabat, la definición de Chothia, la combinación de la definición de Kabat y la definición de Chothia, el sistema de numeración IMGT, la definición de AbM o la definición de contacto de CDR.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humano, comprendiendo el anticuerpo una región variable de la cadena pesada que comprende regiones CDRH1, CDRH2 y CDRH3, y una región variable de la cadena ligera que comprende regiones CDRL1, CDRL2 y CDRL3, en donde las regiones CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 comprenden las secuencias de aminoácidos recogidas en las SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 20 y 21, respectivamente.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 72.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de la línea germinal IGHV3-21 humana. Una o más regiones seleccionadas del marco 1, marco 2, marco 3, CDRH1 y CDRH2 (p. ej., dos, tres, cuatro o cinco de estas regiones) pueden derivarse de una secuencia de la línea germinal IGHV3-21 humana. En una realización, el marco 1, el marco 2, el marco 3, CDRH1 y CDRH2 se derivan todos de una secuencia de la línea germinal IGHV3-21 humana.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% (p. ej., al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y 38-42. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y 38-42. El anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 7. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 12. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 93. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 14. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 94. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 76. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 97.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 73.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de la línea germinal IGKV3-20 o IGKV3-11 humana. Una o más regiones seleccionadas del marco 1, marco 2, marco 3, CDRL1 y CDRL2 (p. ej., dos, tres, cuatro o cinco de estas regiones) pueden derivarse de una secuencia de la línea germinal IGKV3-20 o IGKV3-11 humana. En una realización, el marco 1, el marco 2, el marco 3, CDRL1 y CDRL2 se derivan todos de una secuencia de la línea germinal IGKV3-20 o IGKV3-11 humana.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% (p. ej., al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada de grupo que consiste en SEQ ID NOs: 8 y 43-47. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8 y 43-47. El anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 13. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos recogida en SEQ ID NO: 15.

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de la línea germinal IGHV3-21 humana, y una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de una secuencia de la línea germinal IGKV3-20 o IGKV3-11 humana. Una o más regiones seleccionadas del marco 1, marco 2, marco 3, CDRH1 y CDRH2 (p. ej., dos, tres, cuatro o cinco de estas regiones) pueden derivarse de la secuencia de la línea germinal de IGHV3-21 humana. En una realización, el marco 1, el marco 2, el marco 3, CDRH1 y CDRH2 se derivan todos de la secuencia de la línea germinal IGHV3-21 humana. Una o más regiones seleccionadas del marco 1, marco 2, marco 3, CDRL1 y CDRL2 (p. ej., dos, tres, cuatro o cinco de estas regiones) pueden derivarse de una secuencia de la línea germinal IGKV3-20 o IGKV3-11 humana. En una realización, el marco 1, el marco 2, el marco 3, CDRL1 y CDRL2 se derivan todos de una secuencia de la línea germinal IGKV3-20 o IGKV3-11 humana.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a la proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% (p. ej., al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y 38-42, y una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% (p. ej., al menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99%) idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8 y 43-47. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y 38-42, y una región variable de la cadena

ligera que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8 y 43-47. En determinados aspectos, el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y de la región variable de la cadena ligera recogidas en SEQ ID NO: 7 y 8; 7 y 44; 7 y 45; 38 y 8; 38 y 45; 39 y 43; 39 y 45; 39 y 46; 39 y 47; 40 y 43; 40 y 8; 40 y 44; 40 y 45; 41 y 8; 41 y 44; 41 y 45; 41 y 47; 42 y 43; o 42 y 45, respectivamente. El anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 94; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 76; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 97; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que compite de forma cruzada por la unión a la proteína CTLA-4 humana con un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de las cadenas pesada y ligera recogidas en SEQ ID NOS: 7 y 8, respectivamente.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un anticuerpo aislado que se une al mismo epítipo en la proteína CTLA-4 humana que un anticuerpo que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de las cadenas pesada y ligera recogidas en SEQ ID NOS: 7 y 8, respectivamente.

Se puede utilizar cualquier región constante de Ig en los anticuerpos descritos en esta memoria. En determinadas realizaciones, la región de Ig es una región constante de cadena pesada de IgG₁ humana o de IgG₂ humana.

En determinadas realizaciones, las regiones de IgG de los anticuerpos descritos en esta memoria tienen una mayor afinidad por CD32B (también conocido como FcγRIIB o FCGR2B), *p. ej.*, en comparación con un anticuerpo con una región Fc de tipo salvaje, *p. ej.*, una Fc de IgG₁. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria tienen una afinidad selectivamente incrementada por CD32B (FcγRIIB) tanto sobre CD32A (FcγRIIA) como CD16 (FcγRIIIA). Las alteraciones de secuencia que resultan en una afinidad incrementada por CD32B son conocidas en la técnica, por ejemplo, en Mimoto et al., Protein Engineering, Design & Selection 10: 589-598 (2013), Chu et al., Molecular Immunology 45: 3926-3933 (2008), y Strohl, Current Opinion in Biology 20: 685-691 (2009). En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG₁, o un fragmento de la misma que comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en: G236D, P238D, S239D, S267E, L328F y L328E, y combinaciones de las mismas, numeradas de acuerdo con el índice de la UE (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda (1991)). En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG₁, o un fragmento de la misma que comprende sustituciones S267E y L328F. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG₁ o fragmento de la misma que comprende sustituciones P238D y L328E. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG₁ o fragmento de la misma que comprende una sustitución P238D y una sustitución seleccionada del grupo que consiste en E233D, G237D, H268D, P271G, A330R, y combinaciones de las mismas. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG₁, o fragmento de la misma que comprende sustituciones P238D, E233D, G237D, H268D, P271G, y A330R. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG₁, o fragmento de la misma que comprende G236D y S267E. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG₁, o fragmento de la misma que comprende S239D y S267E. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG₁, o fragmento de la misma que comprende V262E, S267E, y L328F. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG₁, o fragmento de la misma que comprende V264E, S267E, y L328F.

En determinadas realizaciones, las regiones de IgG de los anticuerpos descritos en esta memoria tienen una afinidad incrementada por FcγRIIIA, *p. ej.*, en comparación con un anticuerpo con una región Fc de tipo salvaje, *p. ej.*, una Fc de IgG₁. Alteraciones de la secuencia que resultan en una afinidad incrementada por FcγRIIIA se conocen en la técnica, por ejemplo, en Kellner et al., Methods 65: 105-113 (2014), Lazar et al., Proc Natl Acad Sci 103: 4005-4010 (2006), Shields et al., J Biol Chem. 276(9):6591-6604 (2001). En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG₁, o un fragmento de la misma que comprende una mutación seleccionada del grupo que consiste en: G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305I, A330L, I332E, E333A, K334A, A339T y P396L, y sus combinaciones, numeradas de acuerdo

- con el índice de la UE (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, Bethesda (1991)). En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG1, o fragmento de la misma que comprende S239D. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG1, o fragmento de la misma que comprende T256A. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG1, o fragmento de la misma que comprende K290A. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG1, o fragmento de la misma que comprende S298A. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG1, o fragmento de la misma que comprende I332E. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG1, o fragmento de la misma que comprende E333A. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG1, o fragmento de la misma que comprende K334A. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG1, o fragmento de la misma que comprende A339T. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG1, o fragmento de la misma que comprende S239D e I332E. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG1, o fragmento de la misma que comprende S239D, A330L e I332E. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG1, o fragmento de la misma que comprende S298A, E333A y K334A. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG1, o fragmento de la misma que comprende G236A, S239D e I332E. En determinadas realizaciones, el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, una región constante de IgG1, o fragmento de la misma que comprende F243L, R292P, Y300L, V305I y P396L.
- En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria exhiben actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria inician el agotamiento celular mediado por células asesinas naturales. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria se utilizan para tratar tumores infiltrados con células asesinas naturales. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria exhiben actividad de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP). En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria inician el agotamiento celular mediado por macrófagos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria se utilizan para tratar tumores infiltrados con macrófagos. En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria agotan selectivamente las células T reguladoras intratumorales.
- En determinadas realizaciones, un anticuerpo descrito en esta memoria es un anticuerpo activable que en un estado activado se une a la proteína CTLA-4 humana. En determinadas realizaciones, el anticuerpo activable comprende un resto de enmascaramiento que inhibe la unión del anticuerpo en un estado no escindido a la proteína CTLA-4 humana, y al menos un resto escindible acoplado al anticuerpo, *p. ej.*, en donde el resto escindible es un polipéptido que funciona como sustrato para una proteasa que está enriquecida en el microentorno del tumor. Se describen anticuerpos activables ilustrativos, *p. ej.*, en las Patentes de EE.UU. Nº 8.513.390 y 8.518.404, y las Publicaciones de Solicitudes de Patente Nº US 2014/0255313, US 2014/0010810, US 2014/0023664. En determinadas realizaciones, el anticuerpo activable comprende una región constante de la cadena pesada de IgG humana que es una variante de una región constante de la cadena pesada de IgG humana de tipo salvaje, en donde la región constante de cadena pesada de IgG humana variante se une a FcγRIIIA humana con mayor afinidad que la región constante de la cadena pesada de IgG humana de tipo salvaje se une a FcγRIIIA humana.
- ### 5.3 Composiciones Farmacéuticas
- En esta memoria se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria que tiene el grado deseado de pureza en un soporte, excipiente o estabilizador fisiológicamente aceptable (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Soportes, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (*p. ej.*, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).
- En una realización específica, las composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria y, opcionalmente, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, en un soporte farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, las composiciones farmacéuticas comprenden una

cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en esta memoria y, opcionalmente, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos adicionales, en un soporte farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el anticuerpo es el único ingrediente activo incluido en la composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria pueden ser útiles para inhibir la actividad de CTLA-4 y tratar una afección, tal como el cáncer o una enfermedad infecciosa.

En un aspecto, en esta memoria se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable para uso como un medicamento.

En un aspecto, en esta memoria se proporciona una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable para uso en un método para el tratamiento del cáncer.

Soportes farmacéuticamente aceptables utilizados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y dispersantes, agentes emulsionantes, agentes secuestrantes o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de vehículos acuosos incluyen inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de dextrosa isotónica, inyección de agua estéril, inyección de dextrosa y de Ringer lactada. Vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Se pueden añadir agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungistáticas a preparaciones parenterales envasadas en recipientes de dosis múltiples que incluyen fenoles o cresoles, mercuriales, alcohol bencílico, clorobutanol, ésteres de ácido metil y propil p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Agentes isotónicos incluyen cloruro sódico y dextrosa. Tampones incluyen fosfato y citrato. Antioxidantes incluyen bisulfato de sodio. Anestésicos locales incluyen hidrocloreuro de procaína. Agentes de suspensión y dispersión incluyen carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Agentes emulsionantes incluyen Polisorbato 80 (TWEEN® 80). Un agente secuestrante o quelante de iones de metales incluye EDTA. Soportes farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles con agua; e hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajustar el pH.

Se puede formular una composición farmacéutica para cualquier vía de administración a un sujeto. Ejemplos específicos de vías de administración incluyen intranasal, oral, pulmonar, transdérmica, intradérmica y parenteral. La administración parenteral, caracterizada por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa, también se contempla en esta memoria. Inyectables pueden prepararse en formas convencionales, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los inyectables, las soluciones y emulsiones también contienen uno o más excipientes. Excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas a administrar también pueden contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tampón del pH, estabilizadores, potenciadores de la solubilidad y otros agentes de este tipo, tales como, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas.

Preparaciones para la administración parenteral de un anticuerpo incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos estériles solubles secos, tales como polvos liofilizados, listos para combinarse con un disolvente justo antes del uso, incluyendo tabletas hipodérmicas, suspensiones estériles listas para inyección, productos estériles insolubles secos listos para combinarse con un vehículo justo antes del uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas.

Si se administran por vía intravenosa, soportes adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS) y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol y polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

Mezclas tópicas que comprenden un anticuerpo se preparan como se describe para la administración local y sistémica. La mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsiones o similares y puede formularse como cremas, geles, ungüentos, emulsiones, soluciones, elixires, lociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, aerosoles, supositorios, vendajes, parches dérmicos o cualquier otra formulación adecuada para administración tópica.

Un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria puede formularse como un aerosol para aplicación tópica, tal como por inhalación (véanse, *p. ej.*, las Patentes de EE.UU. N° 4.044.126, 4.414.209 y 4.364.923, que describen aerosoles para el suministro de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma). Estas formulaciones para la administración al tracto respiratorio pueden estar en forma de aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insuflaciones, solo o en combinación con un soporte inerte tal como lactosa. En tal caso, las partículas de la formulación tendrán, en una realización, diámetros de menos de 50 micras, en una realización, de menos de 10 micras.

Un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria puede formularse para aplicación local o tópica, tal como para la aplicación tópica sobre la piel y las membranas mucosas, tal como en el ojo, en forma de geles, cremas y lociones y

para aplicación en el ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. La administración tópica se contempla para el suministro transdérmico y también para la administración a los ojos o la mucosa, o para terapias de inhalación. También se pueden administrar soluciones nasales del anticuerpo solo o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

- 5 Los parches transdérmicos, incluyendo los dispositivos iontoforéticos y electroforéticos, son bien conocidos por los expertos en la técnica, y se pueden utilizar para administrar un anticuerpo. Por ejemplo, parches de este tipo se describen en las Patentes de EE.UU. N° 6.267.983, 6.261.595, 6.256.533, 6.167.301, 6.024.975, 6.010.715, 5.985.317, 5.983.134, 5.948.433 y 5.860.957.

- 10 En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en esta memoria es un polvo liofilizado, que puede reconstituirse para administración en forma de soluciones, emulsiones y otras mezclas. También se puede reconstituir y formular en forma de sólidos o geles. El polvo liofilizado se prepara disolviendo un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en esta memoria, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, en un disolvente adecuado. En algunas realizaciones, el polvo liofilizado es estéril. El disolvente puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o solución reconstituida preparada a partir del polvo. Excipientes que pueden utilizarse incluyen dextrosa, sorbitol, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerol, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado. El disolvente también puede contener un tampón, tal como citrato, fosfato de sodio o potasio u otro tampón conocido por los expertos en la técnica, en una realización, aproximadamente a pH neutro. La filtración estéril posterior de la solución seguida de liofilización en condiciones estándares conocidas por los expertos en la técnica proporciona la formulación deseada. En una realización, la solución resultante se distribuirá en viales para liofilización. Cada uno de los viales contendrá una dosis única o dosis múltiples del compuesto. El polvo liofilizado puede almacenarse en condiciones apropiadas tal como a aproximadamente 4°C a temperatura ambiente. La reconstitución de este polvo liofilizado con agua para inyección proporciona una formulación para uso en administración parenteral. Para la reconstitución, el polvo liofilizado se añade a agua estéril u otro soporte adecuado. La cantidad precisa depende del compuesto seleccionado. Dicha cantidad puede determinarse empíricamente.

- Los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en esta memoria y otras composiciones proporcionados en esta memoria también se pueden formular para ser fijadas como objetivo a un determinado tejido, receptor u otra zona del cuerpo del sujeto a ser tratado. Muchos de estos métodos de fijación de objetivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. Todos estos métodos de fijación de objetivo se contemplan en esta memoria para uso en las presentes composiciones. Para ejemplos de métodos de fijación de objetivo no limitativos, véanse, p. ej., las Patentes de EE.UU. N° 6.316.652, 6.274.552, 6.271.359, 6.253.872, 6.139.865, 6.131.570, 6.120.751, 6.071.495, 6.060.082, 6.048.736, 6.039.975, 6.004.534, 5.985.307, 5.972.366, 5.900.252, 5.840.674, 5.759.542 y 5.709.874. En una realización específica, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en esta memoria fija como objetivo un tumor.

- 35 Las composiciones a utilizar para la administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de, p. ej., membranas de filtración estériles.

5.4 Métodos de Uso

- En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto utilizando los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en esta memoria. Cualquier enfermedad o trastorno en un sujeto que se beneficiaría de la inhibición de la función de CTLA-4 puede ser tratado utilizando los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en esta memoria. Los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en esta memoria son particularmente útiles para inhibir la tolerancia del sistema inmune a los tumores y, por consiguiente, pueden utilizarse como una inmunoterapia para sujetos con cáncer. Por ejemplo, en determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un método para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica del mismo tal como se describe en esta memoria. En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad efectiva del anticuerpo o composición farmacéutica tal como se describe en esta memoria. La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado de la invención o la composición farmacéutica de la invención para uso en un método para el tratamiento del cáncer. En determinadas realizaciones, el sujeto ha recibido previamente una inmunoterapia. En determinadas realizaciones, el sujeto no ha recibido previamente una inmunoterapia. En determinadas realizaciones, el cáncer es un cáncer avanzado o metastásico. Los cánceres que se pueden tratar con los anticuerpos anti-CTLA-4 o las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria incluyen, sin limitación, cáncer sólido (p. ej., cáncer sólido recidivante o refractario, y cáncer sólido avanzado o metastásico), carcinoma, sarcoma, melanoma (p. ej., melanoma en fase III o fase IV), cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer urotelial, cáncer de ovario, cáncer de próstata (p. ej., cáncer de próstata refractario a hormonas metastásicas y cáncer de próstata metastásico progresivo), cáncer de páncreas, cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama HER2⁺ (p. ej., cáncer de mama HER2⁺ recidivante/refractario)), cáncer de cabeza y cuello (p. ej., carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) recidivante/refractario), glioma, glioma maligno, glioblastoma multiforme, metástasis cerebral, cáncer de merkel, cáncer gástrico, cáncer gastroesofágico, carcinoma de células renales, melanoma uveal, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, linfoma (p. ej., linfoma recurrente o refractario), linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin,

leucemia y mieloma múltiple. En determinadas realizaciones, el cáncer se trata con la administración intratumoral de los anticuerpos anti-CTLA-4 o las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria. Los cánceres que se pueden tratar con la administración intratumoral de los anticuerpos anti-CTLA-4 o las composiciones farmacéuticas descritos en esta memoria incluyen, sin limitación, tumores sólidos (p. ej., tumores sólidos avanzados o metastásicos),

5 cáncer de cabeza y cuello (p. ej., carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) recidivante/refractario) y cáncer de mama (p. ej., cáncer de mama HER2⁺ (p. ej., cáncer de mama HER2⁺ recidivante/refractario)).

Cánceres adicionales que pueden tratarse con los anticuerpos anti-CTLA-4 o las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria incluyen, sin limitación, linfomas de células B (p. ej., leucemia linfocítica crónica de células B, linfoma no Hodgkin de células B, linfoma de células B cutáneo, linfoma difuso de células B grandes), carcinoma de células basales, cáncer de vejiga, blastoma, metástasis cerebral, cáncer de mama, linfoma de Burkitt, carcinoma (p. ej., adenocarcinoma (p. ej., de la unión gastroesofágica)), cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer colorrectal (cáncer de colon y cáncer de recto), carcinoma endometrial, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing, linfoma folicular, cáncer gástrico, carcinoma de unión gastroesofágica, cáncer gastrointestinal, glioblastoma (p. ej., glioblastoma multiforme, p. ej., recién diagnosticado o recurrente), glioma, cáncer de cabeza y cuello (p. ej., carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), metástasis hepáticas, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer de riñón (p. ej., carcinoma de células renales y tumores de Wilms), cáncer de laringe, leucemia (p. ej., leucemia mielocítica crónica, leucemia de células pilosas), cáncer de hígado (p. ej., carcinoma hepático y hepatoma), cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas), linfoma linfático, linfoma, linfoma de células del manto, tumor cerebral metastásico, cáncer metastásico, mieloma (p. ej., mieloma múltiple), neuroblastoma, melanoma ocular,

10

15

20

25

cáncer orofaríngeo, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer de páncreas (p. ej., adenocarcinoma pancreático ductal), cáncer de próstata (p. ej., resistente a la hormona (p. ej., resistente a la castración), metastásico, resistente a la hormona metastásica (p. ej., resistente a la castración, independiente de andrógenos), carcinoma de células renales (p. ej., metastásico), carcinoma de glándulas salivales, sarcoma (p. ej., rabdomiosarcoma), cáncer de piel (p. ej., melanoma (p. ej., melanoma metastásico)), sarcoma de partes blandas, tumor sólido, carcinoma de células escamosas, sarcoma de sinovia, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición (cáncer de células uroteliales), melanoma uveal (p. ej., metastásico), carcinoma verrugoso, cáncer de vulva y macroglobulinemia de Waldenstrom.

En algunas realizaciones, el cáncer tratado de acuerdo con el uso descrito en esta memoria es un sarcoma o carcinoma humano, p. ej., fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, adenocarcinomas papilares, cistoadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales (p. ej., metastásico), hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma vesical, carcinoma epitelial, glioma, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma o retinoblastoma. En determinadas realizaciones, el cáncer tratado de acuerdo con el uso descrito en esta memoria es una leucemia linfocítica aguda o leucemia mielocítica aguda (p. ej., mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia); leucemia crónica (leucemia mielocítica crónica (granulocítica) o leucemia linfocítica crónica); enfermedad de Hodgkin; enfermedad no Hodgkin; leucemia mieloide aguda; linfoma de células B; Linfoma de células T; linfoma anaplásico de células grandes; linfoma intraocular; linfoma folicular; linfoma del intestino delgado; o linfoma esplénico de la zona marginal. En determinadas realizaciones, el cáncer tratado de acuerdo con el uso descrito en esta memoria es mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada, tumores del estroma gastrointestinal, cáncer de cabeza y/o cuello (p. ej., carcinoma de células escamosas de la hipofaringe, carcinoma de células escamosas de la laringe, carcinoma de células de la orofaringe o carcinoma verrugoso de la laringe), sarcoma del estroma endometrial, sarcoma de mastocitos, sarcoma de tejido blando adulto, sarcoma uterino, carcinoma de células de merkel, carcinoma urotelial, melanoma con metástasis cerebral, melanoma uveal, melanoma uveal con metástasis hepáticas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer rectal o síndrome mielodisplásico. En algunas realizaciones, el cáncer tratado de acuerdo con el uso es metastásico.

30

35

40

45

50

En determinadas realizaciones, el cáncer tratado de acuerdo con el uso descrito en esta memoria incluye cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, melanoma, cáncer bronquial, cáncer de vejiga, cáncer del cerebro o del sistema nervioso central, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer uterino o endometrial, cáncer de la cavidad oral o faringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer del tracto biliar, cáncer de intestino delgado o apéndice, cáncer de glándulas salivales, cáncer de glándulas tiroides, cáncer de glándulas suprarrenales, cáncer de células escamosas, mesotelioma, osteocarcinoma, timoma/carcinoma tímico, glioblastoma, síndrome mielodisplásico, sarcoma de tejidos blandos, DIPG, adenocarcinoma, osteosarcoma, condrosarcoma, leucemia o cáncer pancreático. En algunas realizaciones, el cáncer tratado de acuerdo con el uso descrito en esta memoria incluye un carcinoma (p. ej., un adenocarcinoma), linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma o leucemia. En determinadas realizaciones, el cáncer tratado de acuerdo con el uso descrito en esta memoria incluye cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de páncreas, glioblastoma, glioma, cáncer de

55

60

cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado (p. ej., carcinoma hepático y hepatoma), cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de mama inflamatorio, carcinoma de células de Merkel, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer de vejiga urinaria, carcinoma endometrial, mieloma (p. ej., mieloma múltiple), glándula salival, carcinoma, cáncer de riñón (p. ej., carcinoma de células renales y tumores de Wilms), carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer de esófago, adenocarcinoma seroso o diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. En determinadas realizaciones, el cáncer tratado de acuerdo con el uso descrito en esta memoria incluye melanoma desmoplásico, cáncer de mama inflamatorio, timoma, cáncer rectal, cáncer anal o glioma de tronco encefálico tratable quirúrgicamente o no tratable quirúrgicamente. En una realización específica, el cáncer es un tumor sólido. En otra realización específica, el cáncer es glioblastoma multiforme. En algunas realizaciones, el glioblastoma multiforme es recurrente. En algunas realizaciones, el glioblastoma multiforme se diagnostica de forma reciente. En algunas realizaciones, el glioblastoma multiforme está en un sujeto que tiene promotores de MGMT no metilados. En algunas realizaciones, el glioblastoma multiforme es refractario a la terapia con Bevacizumab. En algunas realizaciones, el glioblastoma multiforme está en un sujeto que no ha recibido terapia con Bevacizumab.

En algunas realizaciones, el cáncer tratado de acuerdo con el uso descrito en esta memoria es melanoma metastásico (p. ej., melanoma metastásico resistente), cáncer de ovario metastásico o carcinoma de células renales metastásico. En determinadas realizaciones, el cáncer tratado de acuerdo con el uso descrito en esta memoria es un melanoma que es resistente a Ipilimumab. En algunas realizaciones, el cáncer tratado de acuerdo con el uso descrito en esta memoria es melanoma que es resistente a Nivolumab o Pembrolizumab. En algunas realizaciones, el cáncer tratado de acuerdo con el uso descrito en esta memoria es melanoma que es resistente a ipilimumab y Nivolumab o Pembrolizumab.

En determinados aspectos, la presente divulgación proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad infecciosa en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica del mismo tal como se describe en esta memoria. En un aspecto, en esta memoria se proporcionan métodos para prevenir y/o tratar una infección (p. ej., una infección viral, una infección bacteriana, una infección por hongos, una infección por protozoos o una infección parasitaria). La presente invención se refiere a un anticuerpo aislado de la invención o la composición farmacéutica de la invención para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad infecciosa. La infección prevenida y/o tratada de acuerdo con el uso puede ser provocada por un agente infeccioso identificado en esta memoria. En una realización específica, un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria o una composición del mismo es el único agente activo administrado a un sujeto. En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria o una composición del mismo se utiliza en combinación con intervenciones anti-infecciosas (p. ej., antivirales, antibacterianos, antifúngicos o antihelmínticos) para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

Las enfermedades infecciosas que pueden tratarse y/o prevenirse mediante anticuerpos anti-CTLA-4 o composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria son provocadas por agentes infecciosos, incluyendo bacterias, parásitos, hongos, protozoos, y virus. En una realización específica, la enfermedad infecciosa tratada y/o prevenida por anticuerpos anti-CTLA-4 o composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria es provocada por un virus. Las enfermedades virales o infecciones virales que pueden prevenirse y/o tratarse de acuerdo con el uso descrito en esta memoria incluyen las provocadas por hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza (p. ej., influenza A o influenza B), varicela, adenovirus, herpes simplex tipo I (HSV-I), herpes simplex tipo II (HSV-II), peste bovina, rinovirus, ecovirus, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus del papiloma, virus papova, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, huntavirus, virus coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubeola, virus de la polio, viruela, virus de Epstein Barr, virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (VIH-I), virus de la inmunodeficiencia humana tipo II (VIH-II) y agentes de enfermedades virales tales como meningitis viral, encefalitis, dengue o viruela.

Infecciones bacterianas que se pueden prevenir y/o tratar incluyen las infecciones provocadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans*, y *Pseudomonas aeruginosa*. Enfermedades bacterianas provocadas por bacterias (p. ej., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans*, y *Pseudomonas aeruginosa*) que se pueden prevenir y/o tratar de acuerdo con el uso descrito en esta memoria incluyen *Mycobacteria rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), *Bacillus anthracis* (antrax), tétano, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *mycobacterium*, tosferina, cólera, plaga, difteria, *chlamydia*, *S. aureus* y *legionella*.

Enfermedades por protozoos o infecciones por protozoos provocadas por protozoos que pueden prevenirse y/o tratarse de acuerdo con el uso descrito en esta memoria incluyen leishmania, coccidiosis, esquistosoma de tripanosoma o malaria. Enfermedades parasitarias o infecciones parasitarias provocadas por parásitos que pueden prevenirse y/o tratarse de acuerdo con el uso descrito en esta memoria incluyen clamidia y rickettsia.

Enfermedades fúngicas o infecciones fúngicas que pueden prevenirse y/o tratarse de acuerdo con el uso descrito en esta memoria incluyen las provocadas por infecciones por *Candida*, cigomicosis, mastitis por *Candida*, tricosporonosis diseminada progresiva con tricosporonemia latente, candidiasis diseminada, paracoccidioidomicosis pulmonar, aspergilosis pulmonar, neumonía por *Pneumocystis carinii*, meningitis criptocócica, coccidioidal meningoencefalitis y vasculitis cefalorraquídea, infección por *Aspergillus niger*, *Fusarium keratitis*, micosis de los senos paranasales,

endocarditis por *Aspergillus fumigatus*, discondroplasia tibial, vaginitis por *Candida glabrata*, candidiasis orofaríngea, enfermedad granulomatosa crónica ligada al cromosoma X, tiña del pie, candidiasis cutánea, placentitis micótica, tricosporonosis diseminada, aspergilosis broncopulmonar alérgica, queratitis micótica, infección por *Cryptococcus neoformans*, peritonitis fúngica, infección por *Curvularia geniculata*, endoftalmitis estafilocócica y dermatofitosis.

- 5 En determinadas realizaciones, la enfermedad infecciosa es aguda. En determinadas realizaciones, la enfermedad infecciosa es crónica. En determinadas realizaciones, la enfermedad infecciosa es provocada por flavivirus, p. ej., el virus del Nilo Occidental, virus de la *encefalitis de Saint Louis*, virus Powassan, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, virus del dengue, virus del zika, virus de la enfermedad del bosque de Kyasanur, virus de la fiebre amarilla y virus de la chikungunya. . En determinadas realizaciones, la enfermedad infecciosa es provocada por el virus del
- 10 Ébola. En determinadas realizaciones, la enfermedad infecciosa es provocada por el virus de la gripe. En determinadas realizaciones, la enfermedad infecciosa es provocada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis B (VHB) o el virus de la hepatitis C (VHC). En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica del mismo, tal como se describe en esta memoria, fomenta el control viral. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica del mismo, tal como se describe en esta
- 15 memoria, elimina los depósitos virales.

La presente invención se refiere en un aspecto a un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o a una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso como un medicamento .

- 20 La presente divulgación se refiere, en un aspecto, a un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención, y/o a su uso en combinación con soportes o excipientes farmacéuticamente aceptables, para la preparación de composiciones farmacéuticas o medicamentos para la inmunoterapia (p. ej., una inmunoterapia para aumentar la activación de células T en respuesta a un antígeno en un sujeto, tratar el cáncer o tratar o prevenir enfermedades infecciosas).

- 25 La presente invención se refiere en un aspecto a un-anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o a una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable, para utilizar en un método para el tratamiento del cáncer.

La presente divulgación se refiere en un aspecto a un-anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso en un método para inhibir la tolerancia del sistema inmune a tumores y/o para inmunoterapia para sujetos con cáncer.

- 30 La presente invención se refiere en un aspecto a un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o a una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable, para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad infecciosa.

En determinadas realizaciones, estos usos comprenden, además, administrar un agente terapéutico adicional al sujeto.

- 35 En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente que fija como objetivo un punto de control. En determinadas realizaciones, el agente de fijación como objetivo el punto de control se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo antagonista anti-PD-1, un anticuerpo antagonista anti-PD-L1, un anticuerpo antagonista anti-PD-L2, un anticuerpo antagonista anti-CTLA-4 , un anticuerpo antagonista anti-TIM-3, un anticuerpo antagonista anti-LAG-3, un anticuerpo antagonista anti-CEACAM1, un anticuerpo agonista anti-GITR, un anticuerpo agonista anti-OX40, un anticuerpo agonista anti-CD 137, un anticuerpo agonista anti-DR3, un anticuerpo agonista anti-TNFSF14 y un anticuerpo agonista anti-CD27. En determinadas realizaciones, el agente que
- 40 fija como objetivo el punto de control es un anticuerpo antagonista anti-PD-1. En determinadas realizaciones, el agente que fija como objetivo el punto de control es un anticuerpo antagonista anti-PD-L1. En determinadas realizaciones, el agente que fija como objetivo el punto de control es un anticuerpo antagonista anti-LAG-3. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agonista de un miembro de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral o un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral.
- 45

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un soporte farmacéuticamente aceptable o excipiente y (b) un agente terapéutico adicional, para uso como medicamento. En una realización preferida, el agente terapéutico adicional es un agente quimioterapéutico o un agente que fija como objetivo

50 el punto de control.

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable y (b) un agente terapéutico adicional, para uso en un método para el tratamiento del cáncer.

- 55 En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable y (b) un agente terapéutico adicional, para uso en un método para el tratamiento de una enfermedad infecciosa.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con un compuesto que fija como objetivo una o más enzimas inmunomoduladoras, tales como IDO (indolamina-(2,3)-dioxigenasa) y/o TDO (triptófano 2,3-dioxigenasa). En determinadas realizaciones, dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste en epacadostat (Incyte Corp; véase, p. ej., el documento WO 2010/005958, F001287 (Flexus Biosciences), indoximod (NewLink Genetics) y NLG919 (NewLink Genetics). En una realización, el compuesto es epacadostat. En otra realización, el compuesto es F001287. En otra realización, el compuesto es indoximod. En otra realización, el compuesto es NLG919.

En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable y (b) un compuesto que fija como objetivo una enzima inmunomoduladora, para usar como medicamento. En una realización preferida, el compuesto fija como objetivo IDO y/o TDO.

En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable y (b) un compuesto que fija como objetivo una enzima inmunomoduladora, para uso en un método para el tratamiento del cáncer. En una realización preferida, el compuesto fija como objetivo IDO y/o TDO.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria para uso se administra a un sujeto en combinación con una vacuna. En determinadas realizaciones, la vacuna es una vacuna tumoral basada en proteína de choque térmico o una vacuna patógena basada en proteína de choque térmico. En una realización específica, un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con una vacuna tumoral basada en proteína de choque térmico. Proteínas de choque térmico (HSP) son una familia de proteínas altamente conservadas que se encuentran en todas partes en todas las especies. Su expresión puede ser inducida poderosamente a niveles mucho más altos como resultado del choque térmico u otras formas de estrés, incluida la exposición a toxinas, estrés oxidativo o privación de glucosa. Se han clasificado cinco familias de acuerdo con el peso molecular: HSP-110, -90, -70, -60 y -28. Las HSP suministran péptidos inmunogénicos a través de la vía de presentación cruzada en células presentadoras de antígenos (APC), tales como macrófagos y las células dendríticas (DC), lo que conduce a la activación de las células T. Las HSP funcionan como soportes de chaperonas de péptidos antigénicos asociados a tumores que forman complejos capaces de inducir inmunidad específica para el tumor. Tras la liberación de las células tumorales moribundas, los complejos de HSP-antígeno son absorbidos por las células presentadoras de antígenos (APC), en donde los antígenos se procesan en péptidos que se unen a las moléculas MHC de clase I y clase II que conducen a la activación de células T CD8+ y CD4+ antitumorales. La inmunidad provocada por los complejos de HSP derivados de las preparaciones tumorales se dirige específicamente contra el repertorio único de péptidos antigénicos expresados por el cáncer de cada uno de los sujetos.

Un complejo de proteína-péptido de choque térmico (HSPPC) es un complejo de proteína-péptido que consiste en una proteína de choque térmico complejada de forma no covalente con péptidos antigénicos. Las HSPPC provocan respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas. En una realización específica, el o los péptidos antigénicos muestran antigenicidad para el cáncer que está siendo tratado. Las HSPPC se aprovechan de manera eficiente mediante APC a través de receptores de membrana (principalmente CD91) o mediante la unión a receptores tipo Toll. La internalización de HSPPC da como resultado la maduración funcional de las APC con producción de quimioquinas y citoquinas que conduce a la activación de células asesinas naturales (NK), monocitos y respuestas inmunes mediadas por Th1 y Th-2. En determinadas realizaciones, las HSPPC utilizadas en los métodos descritos en esta memoria comprenden una o más proteínas de choque térmico de la familia de proteínas de estrés hsp60, hsp70 o hsp90 complejadas con péptidos antigénicos. En determinadas realizaciones, las HSPPC comprenden hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, gp96, calreticulina o combinaciones de dos o más de las mismas.

En una realización específica, un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria se administra a un sujeto en combinación con un complejo de péptido de proteína de choque térmico (HSPPC), p. ej., complejo de proteína-péptido de choque térmico-96 (HSPPC-96), para tratar el cáncer. HSPPC-96 comprende una proteína de choque térmico (Hsp) de 96 kDa, gp96, complejada a péptidos antigénicos. HSPPC-96 es una inmunoterapia contra el cáncer fabricada a partir del tumor de un sujeto y contiene la "huella dactilar" antigénica del cáncer. En determinadas realizaciones, esta huella dactilar contiene antígenos únicos que están presentes solo en las células cancerosas específicas para ese sujeto particular y la inyección de la vacuna está destinada a estimular el sistema inmunitario del sujeto para que reconozca y ataque cualquier célula con la huella dactilar específica para el cáncer.

En determinadas realizaciones, la HSPPC, p. ej., HSPPC-96, se produce a partir del tejido tumoral de un sujeto. En una realización específica, la HSPPC (p. ej., HSPPC-96) se produce a partir de un tumor del tipo de cáncer o metástasis del mismo que está siendo tratado. En otra realización específica, la HSPPC (p. ej., HSPPC-96) es autóloga al sujeto que está siendo tratado. En determinadas realizaciones, el tejido tumoral es tejido tumoral no necrótico. En determinadas realizaciones, al menos 1 gramo (por ejemplo, al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9 o al menos 10 gramos) de tejido tumoral no necrótico se utiliza para producir un régimen de vacuna. En determinadas realizaciones, después de la resección quirúrgica, el tejido tumoral no necrótico se congela antes de su uso en la preparación de la vacuna. En algunas realizaciones, el HSPPC, p. ej., HSPPC-96, se aísla del tejido tumoral mediante técnicas de purificación, se filtra y se prepara para una

vacuna inyectable. En determinadas realizaciones, a un sujeto se le administran 6-12 dosis de la HSPPC, *p. ej.*, HSPPC-96. En tales realizaciones, las dosis de HSPPC, *p. ej.*, HSPPC-96, pueden administrarse semanalmente para las primeras 4 dosis y luego quincenalmente para las 2-8 dosis adicionales.

Otros ejemplos de HSPPC que pueden utilizarse de acuerdo con el uso descrito en esta memoria se describen en las siguientes patentes y solicitudes de patente. Las patentes de EE.UU. N° 6.391.306, 6.383.492, 6.403.095, 6.410.026, 6.436.404, 6.447.780, 6.447.781 y 6.610.659.

En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable y (b) una vacuna, para uso como medicamento. En una realización preferida, la vacuna es una vacuna tumoral basada en proteína de choque térmico o una vacuna patógena basada en proteína de choque térmico. En una realización preferida, la vacuna es una vacuna viral basada en proteína de choque térmico.

En determinados aspectos, la presente divulgación se refiere a (a) un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y/o una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable y (b) una vacuna, para uso en un método para el tratamiento del cáncer. En una realización preferida, la vacuna es una vacuna tumoral basada en proteína de choque térmico.

El anticuerpo anti-CTLA-4 y el agente terapéutico adicional (*p. ej.*, agente quimioterapéutico, agente que fija como objetivo el punto de control, inhibidor de IDO y/o vacuna) pueden administrarse por separado, secuencialmente o al mismo tiempo como formas de dosificación separadas. En una realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 se administra por vía parenteral, y un inhibidor de IDO se administra por vía oral.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria se administra a un sujeto por vía intratumoral. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria se administra a un sujeto por vía intratumoral en combinación con un agente terapéutico adicional. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional se administra sistémicamente. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene tumores sólidos. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC). En determinadas realizaciones, el sujeto tiene cáncer de mama HER2⁺. En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional que se administra sistémicamente es un anticuerpo anti-PD-1 (*p. ej.*, pembrolizumab o nivolumab). En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional que se administra sistémicamente es un anticuerpo anti-EGFR (*p. ej.*, cetuximab). En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional que se administra sistémicamente es un anticuerpo anti-HER2 (*p. ej.*, trastuzumab). En determinadas realizaciones, el agente terapéutico adicional que se administra sistémicamente es un agente quimioterapéutico (*p. ej.*, gemcitabina). En determinadas realizaciones, el sujeto tiene tumores sólidos y el agente terapéutico adicional que se administra sistémicamente es un anticuerpo anti-PD-1 (*p. ej.*, pembrolizumab o nivolumab). En determinadas realizaciones, el sujeto tiene carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) y el agente terapéutico adicional que se administra sistémicamente es un anticuerpo anti-EGFR (*p. ej.*, cetuximab). En determinadas realizaciones, el sujeto tiene cáncer de mama HER2⁺ y el agente terapéutico adicional que se administra sistémicamente es un anticuerpo anti-HER2 (*p. ej.*, trastuzumab). En determinadas realizaciones, el sujeto recibió, además, un agente quimioterapéutico (*p. ej.*, gemcitabina). En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o composición farmacéutica de la presente invención y, opcionalmente, a un agente terapéutico adicional, para uso en un método para el tratamiento del cáncer, en donde el anticuerpo anti-CTLA-4 y/o la composición farmacéutica de la presente invención se administra al sujeto por vía intratumoral. En una realización preferida, se administra al sujeto un agente terapéutico adicional, más preferiblemente, se administra al sujeto por vía sistémica un agente terapéutico adicional.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-PD-1 se utiliza en los usos descritos en esta memoria. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es Nivolumab, también conocido como BMS-936558 o MDX1106, desarrollado por Bristol-Myers Squibb. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es Pembrolizumab, también conocido como Lambrolizumab o MK-3475, desarrollado por Merck & Co. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es Pidilizumab, también conocido como CT-011, desarrollado por CureTech. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es MEDI0680, también conocido como AMP-514, desarrollado por Medimmune. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es PDR001 desarrollado por Novartis Pharmaceuticals. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es REGN2810 desarrollado por Regeneron Pharmaceuticals. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es PF-06801591 desarrollado por Pfizer. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es BGB-A317 desarrollado por BeiGene. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es TSR-042 desarrollado por AnaptysBio y Tesaro. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 es SHR-1210 desarrollado por Hengrui.

Otros ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-PD-1 que pueden utilizarse en los métodos de tratamiento descritos en esta memoria se describen en las siguientes patentes y solicitudes de patente Patente de EE.UU. N° 6.808.710; Patente de EE.UU. N° 7.332.582; Patente de EE.UU. N° 7.488.802; Patente de EE.UU. N° 8.008.449; Patente de EE.UU. N° 8.114.845; Patente de EE.UU. N° 8.168.757; Patente de EE.UU. N° 8.354.509; Patente de EE.UU. N° 8.686.119; Patente de EE.UU. N° 8.735.553; Patente de EE.UU. N° 8.747.847; Patente de EE.UU. N° 8.779.105; Patente de EE.UU. N° 8.927.697; Patente de EE.UU. N° 8.993.731; Patente de EE.UU. N° 9.102.727; Patente de EE.UU. N° 9.205.148; Publicación de EE.UU. N° US 2013/0202623 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2013/0291136

A1; Publicación de EE.UU. N° US 2014/0044738 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2014/0356363 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2016/0075783 A1; y Publicación PCT N° WO 2013/033091 A1; Publicación PCT N° WO 2015/036394 A1; Publicación PCT N° WO 2014/179664 A2; Publicación PCT N° WO 2014/209804 A1; Publicación PCT N° WO 2014/206107 A1; Publicación PCT N° WO 2015/058573 A1; Publicación PCT N° WO 2015/085847 A1; Publicación PCT N° WO 2015/200119 A1; Publicación PCT N° WO 2016/015685 A1; y Publicación PCT N° WO 2016/020856 A1.

En determinadas realizaciones se utiliza un anticuerpo anti-PD-L1 en los métodos descritos en esta memoria. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es atezolizumab desarrollado por Genentech. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es durvalumab desarrollado por AstraZeneca, Celgene y Medimmune. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es avelumab, también conocido como MSB0010718C, desarrollado por Merck Serono y Pfizer. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es MDX-1105 desarrollado por Bristol-Myers Squibb. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-L1 es AMP-224 desarrollado por Amplimmune y GSK.

Ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-PD-L1 que pueden utilizarse en los métodos de tratamiento descritos en esta memoria se describen en las siguientes patentes y solicitudes de patente: Patente de EE.UU. N° 7.943.743; Patente de EE.UU. N° 8.168.179; Patente de EE.UU. N° 8.217.149; Patente de EE.UU. N° 8.552.154; Patente de EE.UU. N° 8.779.108; Patente de EE.UU. N° 8.981.063; Patente de EE.UU. N° 9.175.082; Publicación de EE.UU. N° US 2010/0203056 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2003/0232323 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2013/0323249 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2014/0341917 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2014/0044738 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2015/0203580 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2015/0225483 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2015/0346208 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2015/0355184 A1; y Publicación PCT N° WO 2014/100079 A1; Publicación PCT N° WO 2014/022758 A1; Publicación PCT N° WO 2014/055897 A2; Publicación PCT N° WO 2015/061668 A1; Publicación PCT N° WO 2015/109124 A1; Publicación PCT N° WO 2015/195163 A1; Publicación PCT N° WO 2016/000619 A1; y Publicación PCT N° WO 2016/030350 A1.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-LAG-3 se utiliza en los usos descritos en esta memoria. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-LAG-3 es BMS-986016 desarrollado por Bristol-Myers Squibb. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-LAG-3 es LAG525 desarrollado por Novartis. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-LAG-3 es GSK2831781 desarrollado por GSK.

Ejemplos no limitantes de anticuerpos anti-LAG-3 que pueden utilizarse en los usos de tratamiento descritos en esta memoria se describen en las siguientes patentes y solicitudes de patente: Patente de EE.UU. N° 9.244.059; Publicación de EE.UU. N° US 2011/0150892 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2014/0093511 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2014/0286935 A1; Publicación de EE.UU. N° US 2015/0259420 A1; y Publicación PCT N° WO 2015/042246 A1; Publicación PCT N° WO 2015/116539 A1; Publicación PCT N° WO 2015/200119 A1; y Publicación PCT N° WO 2016/028672 A1.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-EGFR se utiliza en los usos descritos en esta memoria. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-EGFR es cetuximab desarrollado por Bristol-Myers Squibb e ImClone, panitumumab desarrollado por Abgenix y Amgen, nimotuzumab desarrollado por CMI Cuba e YM BioSciences, necitumumab desarrollado por ImClone, zalutumumab desarrollado por Genmab, matuzumab desarrollado por Takeda, Sym004 desarrollado por Merck Serono y Symphogen, imgatuzumab desarrollado por Glycart y Roche, duligotumab desarrollado por Genentech y Roche, depatuxizumab desarrollado por Abbott, depatuxizumab mafodotin desarrollado por Abbvie, MM-151 desarrollado por Adimab y Merrimack, GC1118 desarrollado por Green Cross, AMG 595 desarrollado por Amgen e ImmunoGen, CetuGEX desarrollado por Glycotope, laprituximab emtansine desarrollado por ImmunoGen, JNJ-61186372 desarrollado por Genmab y Janssen Biotech, SCT200 desarrollado por Sinocelltech, LY3164530 desarrollado por Lilly, HLX07 desarrollado por Shanghai Henlius o SYN004 desarrollado por Synermore.

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

Un anticuerpo o una composición farmacéutica descrito en esta memoria puede suministrarse a un sujeto por una diversidad de vías. Estas incluyen las vías parenteral, intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, tópica, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, intravenosa, intratumoral, conjuntival y subcutánea. La administración pulmonar también se puede emplear, *p. ej.*, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante para uso como un aerosol. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o la composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra por vía subcutánea o intravenosa. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o la

composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra por vía intratumoral. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra a un ganglio linfático que drena el tumor. En determinadas realizaciones, el anticuerpo o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra a través de una administración localizada (p. ej., administración subcutánea). En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se suministra sistémicamente. En determinadas realizaciones, el anticuerpo anti-CTLA-4 o la composición farmacéutica descrita en esta memoria se suministra localmente.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o composición farmacéutica de la presente invención, y opcionalmente a un agente terapéutico adicional, para uso en un método para el tratamiento del cáncer, en el que el anticuerpo anti-CTLA-4 y/o la composición farmacéutica de la presente invención se suministra por vía intratumoral al sujeto, se administra a un ganglio linfático que drena el tumor de un sujeto o se suministra a través de una administración localizada (p. ej., administración subcutánea) a un sujeto.

La cantidad de un anticuerpo o composición que será eficaz en el tratamiento y/o la prevención de una afección dependerá de la naturaleza de la enfermedad, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándares.

La dosis precisa a emplear en una composición también dependerá de la vía de administración, y la gravedad de la infección o enfermedad provocada por ella, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del profesional y las circunstancias de cada uno de los sujetos. Por ejemplo, dosis efectivas también pueden variar dependiendo de los medios de administración, del sitio diana, del estado fisiológico del paciente (incluida la edad, el peso corporal y la salud), si el paciente es humano o un animal, de otros medicamentos administrados o si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano, pero también se pueden tratar mamíferos no humanos, incluidos mamíferos transgénicos. Las dosis de tratamiento se titulan de manera óptima para optimizar la seguridad y la eficacia.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra a un sujeto (p. ej., mediante inyección intravenosa) a razón de 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra a un sujeto (p. ej., vía inyección intravenosa) cada tres semanas a las dosis arriba descritas.

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

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto (p.ej., vía inyección intravenosa) a razón de 0,1 mg/kg o aproximadamente 0,1 mg/kg cada tres semanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto (p. ej., vía inyección intravenosa) a razón de 0,3 mg/kg o aproximadamente 0,3 mg/kg cada tres semanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto (p. ej., vía inyección intravenosa) a razón de 1 mg/kg o aproximadamente 1 mg/kg cada tres semanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto (p. ej., vía inyección intravenosa) a razón de 3 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg cada tres semanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto (p. ej., vía inyección intravenosa) a razón de 6 mg/kg o aproximadamente 6 mg/kg cada tres semanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto (p. ej., vía inyección intravenosa) a razón de 10 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg cada tres semanas.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrita en esta memoria se administra a un sujeto vía inyección intratumoral a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,03 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto vía inyección intratumoral cada tres semanas a las dosis arriba descritas.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto vía inyección intratumoral a razón de 0,01 mg/kg o aproximadamente 0,01 mg/kg cada tres semanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto vía inyección intratumoral a razón de 0,03 mg/kg o aproximadamente 0,03 mg/kg cada tres semanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto vía inyección intratumoral a razón de 0,1 mg/kg o aproximadamente 0,1

mg/kg cada tres semanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto vía inyección intratumoral a razón de 0,3 mg/kg o aproximadamente 0,3 mg/kg cada tres semanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto vía inyección intratumoral a razón de 1 mg/kg o aproximadamente 1 mg/kg cada tres semanas. En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto vía inyección intratumoral a razón de 3 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg cada tres semanas.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo anti-CTLA-4 o composición farmacéutica descrito en esta memoria se administra a un sujeto vía inyección administración localizada (p. ej., administración subcutánea) a razón de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, aproximadamente 0.01 mg/kg, aproximadamente 0.03 mg/kg, aproximadamente 0.1 mg/kg, aproximadamente 0.3 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg o aproximadamente 3 mg/kg.

Un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria también se puede utilizar para someter a ensayo los niveles de proteína CTLA-4 en una muestra biológica utilizando métodos inmunohistológicos clásicos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo inmunoensayos, tales como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoprecipitación o transferencia Western. Marcadores de ensayo de anticuerpos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen marcadores de enzimas, tales como glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{121}In) y tecnecio (^{99}Tc); marcadores luminiscentes, tales como luminol; y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina. Marcadores de este tipo pueden utilizarse para marcar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en esta memoria. Alternativamente, un segundo anticuerpo que reconoce un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en esta memoria puede marcarse y utilizarse en combinación con un anticuerpo anti-CTLA-4 o fragmento de unión a antígeno del mismo para detectar niveles de proteína CTLA-4. En una realización, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención, para someter a ensayo y/o detectar niveles de proteína CTLA-4 en una muestra biológica *in vitro*.

El ensayo para el nivel de expresión de la proteína CTLA-4 pretende incluir medir o estimar cualitativa o cuantitativamente el nivel de una proteína CTLA-4 en una primera muestra biológica ya sea directamente (p. ej., determinando o estimando el nivel absoluto de proteína) o relativamente (p. ej., comparando el nivel de proteína asociado a la enfermedad en una segunda muestra biológica). El nivel de expresión del polipéptido CTLA-4 en la primera muestra biológica puede medirse o estimarse y compararse con un nivel de proteína CTLA-4 estándar, tomando el patrón de una segunda muestra biológica obtenida de un individuo que no tiene el trastorno o que se determina mediante niveles promedio de una población de individuos que no tienen el trastorno. Tal como se apreciará en la técnica, una vez que se conoce el nivel de polipéptido CTLA-4 "estándar", se puede utilizar repetidamente como un patrón para comparación.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra biológica obtenida de un sujeto, línea celular, tejido u otra fuente de células que potencialmente expresan CTLA-4. Métodos para obtener biopsias de tejidos y fluidos corporales de animales (p. ej., seres humanos) son bien conocidos en la técnica. Muestras biológicas incluyen células de la sangre periférica mononucleares.

Un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en esta memoria puede utilizarse para aplicaciones de pronóstico, diagnóstico, monitorización y rastreo, incluidas aplicaciones *in vitro* e *in vivo* bien conocidas y estándares para el experto en la técnica y basadas en la presente descripción. Se pueden utilizar ensayos y kits de pronóstico, diagnóstico, monitorización y rastreo para la valoración *in vitro* y la evaluación del estado del sistema inmune y/o la respuesta inmune se puede utilizar para predecir, diagnosticar y monitorizar para evaluar muestras de pacientes, incluyendo aquellas que se sabe que tienen o se sospecha que tienen una disfunción del sistema inmune o con respecto a una respuesta del sistema inmune anticipada o deseada, respuesta de antígeno o respuesta de vacuna. La valoración y evaluación del estado del sistema inmune y/o la respuesta inmune también es útil para determinar la idoneidad de un paciente para un ensayo clínico de un fármaco o para la administración de un agente quimioterapéutico particular o un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, que incluye combinaciones de los mismos, frente a un agente o anticuerpo diferente o fragmento de unión a antígeno del mismo. Este tipo de monitorización y evaluación de pronóstico y diagnóstico ya está en la práctica utilizando anticuerpos contra la proteína HER2 en el cáncer de mama (HercepTest™, Dako), en que el ensayo también se utiliza para evaluar a los pacientes en cuanto a la terapia con anticuerpos utilizando Herceptin®. Aplicaciones *In vivo* incluyen terapia celular dirigida y modulación del sistema inmune e imágenes de radio de respuestas inmunes.

En un aspecto, la presente divulgación se refiere a un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o composición farmacéutica de la presente invención para uso como un agente de diagnóstico.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CTLA-4 y/o composición farmacéutica de la presente invención para uso en un método para la predicción, diagnóstico y/o monitorización de una disfunción del sistema inmune y/o cáncer.

En una realización, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo anti-CTLA-4 de la invención, para predecir, diagnosticar y/o monitorizar una disfunción del sistema inmune y/o el cáncer en un sujeto mediante ensayo y/o detectar niveles de proteína CTLA-4 en una muestra biológica del sujeto *in vitro*.

En una realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o fragmento de unión a antígeno del mismo puede utilizarse en la inmunohistoquímica de muestras de biopsia. En otra realización, un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo se puede utilizar para detectar niveles de CTLA-4, o niveles de células que contienen CTLA-4 en su superficie de la membrana, niveles que luego pueden ligarse a determinados síntomas de la enfermedad. Anticuerpos anti-CTLA-4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en esta memoria pueden llevar un marcador detectable o funcional. Cuando se utilizan marcadores de fluorescencia, se puede utilizar la microscopía disponible actualmente y el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o la combinación de ambos métodos conocidos en la técnica para identificar y cuantificar los miembros de unión específicos. Anticuerpos anti-CTLA-4 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en esta memoria pueden llevar un marcador de fluorescencia. Marcadores de fluorescencia ilustrativos incluye, por ejemplo, sondas reactivas y conjugadas, p. ej., aminocoumarina, fluoresceína y rojo Texas, colorantes Alexa Fluor, colorantes Cy y colorantes DyLight. Un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo puede llevar un marcador radiactivo, tal como los isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac y ^{186}Re . Cuando se utilizan marcadores radiactivos, los procedimientos de recuento disponibles actualmente conocidos en la técnica pueden utilizarse para identificar y cuantificar la unión específica del anticuerpo anti-CTLA-4 o el fragmento de unión a antígeno del mismo a CTLA-4 (p. ej., CTLA-4 humana). En el caso en el que el marcador es una enzima, la detección puede llevarse a cabo mediante cualquiera de las técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluoroespectrofotométricas, amperométricas o gasométricas utilizadas actualmente tal como se conoce en la técnica. Esto se puede lograr poniendo en contacto una muestra o una muestra de control con un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento de unión a antígeno del mismo en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y CTLA-4. Cualesquiera complejos formados entre el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y CTLA-4 se detectan y comparan en la muestra y el control. A la vista de la unión específica de los anticuerpos descritos en esta memoria para CTLA-4, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos pueden utilizarse para detectar específicamente la expresión de CTLA-4 en la superficie de las células. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos descritos en esta memoria también se pueden utilizar para purificar CTLA-4 mediante purificación por inmutafinidad. También se incluye en esta memoria un sistema de ensayo que puede prepararse en forma de un kit de ensayo para el análisis cuantitativo del grado de presencia de, por ejemplo, CTLA-4 o complejos de CTLA-4/ligando de CTLA-4. El sistema o kit de ensayo puede comprender un componente marcado, p. ej., un anticuerpo marcado, y uno o más reactivos inmunoquímicos adicionales.

En una realización, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para someter a ensayo y/o detectar niveles de proteína CTLA-4 en una muestra biológica, que comprende (1) poner en contacto una muestra y, opcionalmente, una muestra de control con un anticuerpo anti-CTLA-4 o fragmento de unión a antígeno del mismo de la invención en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo y CTLA-4, y (2) detectar y comparar los complejos formados en la muestra y opcionalmente el control.

5.5 Polinucleótidos, Vectores y Métodos para Producir Anticuerpos Anti-CTLA-4

En otro aspecto, en esta memoria se proporcionan polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo descrito en esta memoria o un fragmento del mismo (p. ej., una región variable de la cadena ligera y/o región variable de la cadena pesada) que se une específicamente a un antígeno CTLA-4 (p. ej., antígeno CTLA-4 humano, y vectores, p. ej., vectores que comprenden polinucleótidos de este tipo para la expresión recombinante en células huésped (p. ej., *E. coli* y células de mamífero). En esta memoria se proporcionan polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican cualquiera de los anticuerpos proporcionados en esta memoria, así como vectores que comprenden secuencias de polinucleótidos de este tipo, p. ej., vectores de expresión para su expresión eficiente en células huésped, p. ej., células de mamífero.

Tal como se utiliza en esta memoria, una molécula de ácido nucleico o polinucleótido "aislada" es una que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural (p. ej., en un ratón o un ser humano) de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Por ejemplo, el lenguaje "sustancialmente libre" incluye preparaciones de polinucleótidos o moléculas de ácido nucleico que tienen menos de aproximadamente 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% o 0,1% (en particular, menos de aproximadamente 10%) de otro material, p. ej., material celular, medio de cultivo, otras moléculas de ácido nucleico, precursores químicos y/u otros productos químicos. En una realización específica, se aíslan o purifican una o más moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo descrito en esta memoria.

En aspectos particulares, en esta memoria se proporcionan polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se unen específicamente a un polipéptido CTLA-4 (p. ej., CTLA-4 humana) y comprenden una secuencia de aminoácidos tal como se describe

en esta memoria, así como anticuerpos que compiten con dichos anticuerpos para unirse a un polipéptido CTLA-4 (*p. ej.*, de manera dependiente de la dosis) o que se une al mismo epítipo que el de dichos anticuerpos.

En determinados aspectos, en esta memoria se proporcionan polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera o la cadena pesada de un anticuerpo descrito en esta memoria. Los polinucleótidos pueden comprender secuencias de nucleótidos que codifican una cadena ligera que comprende las VL FR y CDR de los anticuerpos descritos en esta memoria (véase, *p. ej.*, la Tabla 1). La presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica: una región variable de la cadena pesada del anticuerpo de la invención y una región variable de la cadena ligera del anticuerpo de la invención; o una cadena pesada del anticuerpo de la invención y una cadena ligera del anticuerpo de la invención.

También se proporcionan en esta memoria polinucleótidos que codifican un anticuerpo anti-CTLA-4 que se optimizan, *p. ej.* mediante optimización de codón/ARN, reemplazo por secuencias de señal heterólogas y eliminación de elementos de inestabilidad de ARNm. Métodos para generar ácidos nucleicos optimizados que codifican un anticuerpo anti-CTLA-4 o un fragmento del mismo (*p. ej.*, cadena ligera, cadena pesada, dominio VH o dominio VL) para la expresión recombinante mediante la introducción de cambios de codones y/o eliminación de regiones inhibitorias en el ARNm puede llevarse a cabo adaptando los métodos de optimización descritos en, *p. ej.*, las patentes de EE.UU. N° 5,965,726; 6.174.666; 6.291.664; 6.414.132; y 6.794.498, en consecuencia. Por ejemplo, sitios potenciales de corte y empalme y los elementos de inestabilidad (*p. ej.*, elementos ricos en A/T o A/U) dentro del ARN pueden mutarse sin alterar los aminoácidos codificados por las secuencias de ácido nucleico para aumentar la estabilidad del ARN para la expresión recombinante. Las alteraciones utilizan la degeneración del código genético, *p. ej.*, utilizando un codón alternativo para un aminoácido idéntico. En algunos aspectos, puede ser deseable alterar uno o más codones para codificar una mutación conservadora, *p. ej.*, un aminoácido similar con estructura y propiedades químicas y/o función similares como el aminoácido original. Métodos de este tipo pueden aumentar la expresión de un anticuerpo anti-CTLA-4 o fragmento del mismo en al menos 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o 100 veces o más en relación con la expresión de un anticuerpo anti-CTLA-4 codificado por polinucleótidos que no han sido optimizados.

En determinados aspectos, una secuencia de polinucleótidos optimizada que codifica un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria o un fragmento del mismo (*p. ej.*, dominio VL y/o dominio VH) puede hibridarse con un polinucleótido antisentido (*e.g.* complementario) de una secuencia de polinucleótidos no optimizada que codifica un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria o un fragmento del mismo (*p. ej.*, dominio VL y/o dominio VH). En aspectos específicos, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria o un fragmento se hibrida en condiciones de alta rigurosidad con un polinucleótido antisentido de una secuencia de polinucleótidos no optimizada que codifica un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria o un fragmento del mismo. En un aspecto específico, una secuencia de nucleótidos optimizada que codifica un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria o un fragmento del mismo se hibrida en condiciones de hibridación de alta rigurosidad, rigurosidad intermedia o inferior con un polinucleótido antisentido de una secuencia de nucleótidos no optimizada que codifica un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria o un fragmento del mismo. Se ha descrito información sobre las condiciones de hibridación, véase, *p. ej.*, la Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. N° US 2005/0048549 (*p. ej.*, párrafos 72-73).

Los polinucleótidos pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse por cualquier método conocido en la técnica. Las secuencias de nucleótidos que codifican los anticuerpos descritos en esta memoria, *p. ej.*, los anticuerpos descritos en la Tabla 1, y las versiones modificadas de estos anticuerpos pueden determinarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica, es decir, los codones de nucleótidos que se sabe que codifican aminoácidos particulares se ensamblan de tal manera para generar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Un polinucleótido de este tipo que codifica el anticuerpo puede ensamblarse a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (*p. ej.*, como se describe en Kutmeier G et al., (1994), BioTechniques 17: 242-6), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, reasociación y ligadura de esos oligonucleótidos, y luego amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo descrito en esta memoria puede generarse a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada (*p. ej.*, un hibridoma) utilizando métodos bien conocidos en la técnica (*p. ej.*, PCR y otros métodos de clonación molecular). Por ejemplo, la amplificación por PCR utilizando cebadores sintéticos hibridables a los extremos 3' y 5' de una secuencia conocida puede realizarse utilizando ADN genómico obtenido de células de hibridoma que producen el anticuerpo de interés. Métodos de amplificación por PCR de este tipo se pueden utilizar para obtener ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que codifica la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo. Métodos de amplificación por PCR de este tipo se pueden utilizar para obtener ácidos nucleicos que comprenden la secuencia que codifica la región variable de la cadena ligera y/o la región variable de la cadena pesada de un anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados pueden clonarse en vectores para la expresión en células huésped y para la clonación adicional, por ejemplo, para generar anticuerpos quiméricos y humanizados.

Si no está disponible un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina puede sintetizarse químicamente u obtenerse de una fuente adecuada (*p. ej.*, una colección de ADNc de anticuerpo o una colección de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferiblemente ARN poli A+, aislado de cualquier tejido o células que

expresen el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo descrito en esta memoria) mediante amplificación por PCR utilizando cebadores sintéticos hibridables a los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación utilizando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia del gen particular para identificar, *p. ej.*, un clon de ADNc de una colección de ADNc que codifica el anticuerpo. Ácidos nucleicos amplificados generados por PCR se pueden clonar en vectores de clonación replicables utilizando cualquier método bien conocido en la técnica.

El ADN que codifica los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en esta memoria puede aislarse y secuenciarse fácilmente utilizando procedimientos convencionales (*p. ej.*, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos anti-CTLA-4). Células de hibridoma pueden servir como fuente de un ADN de este tipo. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) (*p. ej.*, células CHO del CHO GS System™ (Lonza)), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos anti-CTLA-4 en las células huésped recombinantes.

Para generar anticuerpos completos, pueden utilizarse cebadores de PCR que incluyen secuencias de nucleótidos VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia flanqueante para proteger el sitio de restricción para amplificar las secuencias VH o VL en clones scFv. Utilizando técnicas de clonación conocidas por los expertos en la técnica, los dominios VH amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante de la cadena pesada, *p. ej.*, la región constante gamma 4 humana, y los dominios VL amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante de la cadena ligera, *p. ej.*, regiones constantes kappa o lambda humanas. En determinadas realizaciones, los vectores para expresar los dominios VH o VL comprenden un promotor EF-1 α , una señal de secreción, un sitio de clonación para la región variable, dominios constantes y un marcador de selección tal como neomicina. Los dominios VH y VL también se pueden clonar en un vector que expresa las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión de la cadena pesada y los vectores de conversión de la cadena ligera se co-transfectan luego en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, *p. ej.*, IgG, utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de la cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias murinas, o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulínico.

También se proporcionan polinucleótidos que hibridan en condiciones de hibridación de alta rigurosidad, rigurosidad intermedia o baja con polinucleótidos que codifican un anticuerpo descrito en esta memoria. En aspectos específicos, los polinucleótidos descritos en esta memoria hibridan en condiciones de hibridación de alta rigurosidad, rigurosidad intermedia o baja con polinucleótidos que codifican un dominio VH y/o un dominio VL proporcionado en esta memoria.

Condiciones de hibridación se han descrito en la técnica y las conoce un experto en la técnica. Por ejemplo, la hibridación en condiciones rigurosas puede implicar la hibridación a ADN unido al filtro en 6x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 0,2xSSC /SDS al 0,1% a aproximadamente 50-65°C; la hibridación en condiciones altamente rigurosas puede implicar hibridación con ácido nucleico unido al filtro en 6xSSC a aproximadamente 45°C seguido de uno o más lavados en 0,1xSSC/SDS al 0,2% a aproximadamente 68°C. La hibridación en otras condiciones de hibridación rigurosa es conocida por los expertos en la técnica y se han descrito, véase, por ejemplo, Ausubel FM et al., eds., (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3.

En determinados aspectos, en esta memoria se proporcionan células (*p. ej.*, células huésped) que expresan (*p. ej.*, de forma recombinante) anticuerpos descritos en esta memoria (o un fragmento de unión a antígeno del mismo) que se unen específicamente a CTLA-4 (*p. Ej.*, CTLA-4 humana) y polinucleótidos relacionados y vectores de expresión. En esta memoria se proporcionan vectores (*p. ej.*, vectores de expresión) que comprenden polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos anti-CTLA-4 o un fragmento para la expresión recombinante en células huésped, preferiblemente en células de mamífero. También se proporcionan en esta memoria células huésped que comprenden este tipo de vectores para expresar de forma recombinante anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en esta memoria (*p. ej.*, anticuerpo humano o humanizado). En un aspecto particular, en esta memoria se proporcionan métodos para producir un anticuerpo descrito en esta memoria, que comprenden expresar dicho anticuerpo a partir de una célula huésped. La presente invención se refiere a un vector que comprende el polinucleótido de la invención. La presente invención se refiere a una célula huésped recombinante que comprende un polinucleótido de la invención.

La expresión recombinante de un anticuerpo descrito en esta memoria (*p. ej.*, un anticuerpo de longitud completa, la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo, o un anticuerpo de cadena sencilla descrito en esta memoria) que se une específicamente a CTLA-4 (*p. ej.*, CTLA-4 humana) implica la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, la cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo, o un fragmento del mismo (*p. ej.*, regiones variables de cadena pesada y/o ligera) descritos en esta memoria, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Por lo tanto,

se describen en esta memoria métodos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (*p. ej.*, cadena ligera o cadena pesada) que codifica la secuencia de nucleótidos. Métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica se pueden utilizar para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (*p. ej.*, cadena ligera o cadena pesada) y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. También se proporcionan vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo descrita en esta memoria, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, una región variable de la cadena pesada o ligera de un anticuerpo o un fragmento del mismo, o una CDR de cadena pesada o ligera, enlazada operativamente a un promotor. Vectores de este tipo pueden incluir, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véanse, *p. ej.* las Publicaciones Internacionales Nº WO 86/05807 y WO 89/01036; y la Patente de EE.UU. Nº 5.122.464) y regiones variables del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para la expresión de la cadena pesada completa, la cadena ligera completa o ambas cadenas pesada y ligera.

Un vector de expresión puede transferirse a una célula (*p. ej.*, célula huésped) mediante técnicas convencionales y las células resultantes pueden cultivarse luego mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo descrito en esta memoria o un fragmento del mismo. Por lo tanto, en esta memoria se proporcionan células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo descrito en esta memoria o fragmentos del mismo, o una cadena pesada o ligera del mismo, o un fragmento del mismo, o un anticuerpo de cadena sencilla descrito en esta memoria, enlazado operativamente a un promotor para la expresión de secuencias de este tipo en la célula huésped. En determinadas realizaciones, para la expresión de anticuerpos de doble cadena, los vectores que codifican tanto la cadena pesada como la ligera, individualmente, se pueden co-exresar en la célula huésped para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, tal como se detalla más adelante. En determinadas realizaciones, una célula huésped contiene un vector que comprende un polinucleótido que codifica tanto la cadena pesada como la cadena ligera de un anticuerpo descrito en esta memoria, o un fragmento del mismo. En realizaciones específicas, una célula huésped contiene dos vectores diferentes, un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en esta memoria, o un fragmento del mismo, y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera o una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo descrito en esta memoria, o un fragmento del mismo. En otras realizaciones, una primera célula huésped comprende un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena pesada o una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo descrito en esta memoria, o un fragmento del mismo, y una segunda célula huésped comprende un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una cadena ligera o una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo descrito en esta memoria. En realizaciones específicas, una región variable de la cadena pesada/cadena pesada expresada por una primera célula asociada con una región variable de la cadena ligera/cadena ligera de una segunda célula para formar un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En determinadas realizaciones, en esta memoria se proporciona una población de células huésped que comprende dicha primera célula huésped y dicha segunda célula huésped.

En una realización particular, en esta memoria se proporciona una población de vectores que comprende un primer vector que comprende un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena ligera/cadena ligera de un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria, y un segundo vector que comprende un polinucleótido que codifica una región variable de la cadena pesada/cadena pesada de un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria.

Se puede utilizar una diversidad de sistemas de vectores de expresión del huésped para expresar moléculas de anticuerpo descritas en esta memoria (véase, *p. ej.*, la Patente de EE.UU. Nº 5.807.715). Sistemas de expresión del huésped de este tipo representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de interés pueden ser producidas y posteriormente purificadas, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo descrita en esta memoria *in situ*. Estos incluyen microorganismos tales como bacterias (*p. ej.*, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófagos recombinante, vectores que expresan ADN plasmídico o ADN cosmídico que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (*p. ej.*, *Saccharomyces Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (*p. ej.*, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales (*p. ej.*, algas verdes, tales como *Chlamydomonas reinhardtii*) infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (*p. ej.*, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (*p. ej.*, plásmido Ti) que contienen secuencias de anticuerpos codificantes; o sistemas de células de mamífero (*p. ej.*, células COS (*p. ej.*, COS1 o COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa y NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 y BMT10) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (*p. ej.*, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (*p. ej.*, el promotor tardío de adenovirus; el promotor del virus vaccinia 7,5K). En una realización específica, las células para expresar anticuerpos descritos en esta memoria o un fragmento de unión a antígeno de los mismos son células CHO, por ejemplo células CHO del CHO GS System™ (Lonza). En una realización particular, células para expresar anticuerpos descritas en esta memoria son células humanas, *p. ej.*, líneas

celulares humanas. En una realización específica, un vector de expresión de mamífero es pOptiVEC™ o pcDNA3.3. En una realización particular, células bacterianas, tales como *Escherichia coli*, o células eucariotas (*p. ej.*, células de mamífero), especialmente para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante completa, se utilizan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, células de mamíferos, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector, tal como el principal elemento promotor genético intermedio temprano del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking MK y Hofstetter H (1986) *Gene* 45: 101-5; y Cockett MI et al., (1990) *Biotechnology* 8(7): 662-7). En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en esta memoria son producidos por células CHO o células NS0. En una realización específica, la expresión de secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos descritos en esta memoria que se unen específicamente a CTLA-4 (*p. ej.* CTLA-4 humana) está regulada por un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor específico de tejido.

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente un cierto número de vectores de expresión dependiendo del uso previsto para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de un anticuerpo de este tipo, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables los vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Vectores de este tipo incluyen el vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruether U y Mueller-Hill B (1983) *EMBO J* 2: 1791-1794), en el que la secuencia codificante de anticuerpos puede ligarse individualmente en el vector en marco con la región codificante Z para que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye S e Inouye M (1985) *Nuc Acids Res* 13: 3101-3109; Van Heeke G y Schuster SM (1989) *J Biol Chem* 24: 5503-5509); y similares. Por ejemplo, los vectores pGEX también se pueden utilizar para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST). En general, proteínas de fusión de este tipo son solubles y pueden purificarse fácilmente de las células lisadas mediante adsorción y unión a perlas de glutatión agarosa de la matriz, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de proteasa de factor Xa o trombina para que el producto del gen diana clonado pueda liberarse del resto GST.

En un sistema de insectos, el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV), por ejemplo, puede utilizarse como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpos puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina).

En células huésped de mamíferos se puede utilizar un cierto número de sistemas de expresión basados en virus. En los casos en que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de anticuerpos de interés puede ligarse a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, *p. ej.*, el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. Este gen quimérico se puede insertar en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (*p. ej.*, región EI o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en huéspedes infectados (*p. ej.*, véase Logan J y Shenk T (1984). *PNAS* 81(12): 3655-9). Las señales de iniciación específicas también pueden ser necesarias para la traducción eficiente de secuencias codificantes de anticuerpos insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de toda la inserción. Estas señales de control de la traducción exógenas y codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, *etc.* (véase, *p. ej.*, Bitter G et al., (1987) *Methods Enzymol.* 153: 516-544).

Además, se puede elegir una cepa de la célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Modificaciones de este tipo (*p. ej.*, glicosilación) y procesamiento (*p. ej.*, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación postraduccional de proteínas y productos génicos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, se pueden utilizar células huésped eucarióticas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción primaria, la glicosilación y la fosforilación del producto génico. Células huésped de mamíferos de este tipo incluyen CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma murino que no produce endógenamente cadena de inmunoglobulina alguna), CRL7030, COS (*p. ej.*, células COS1 o COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 y HsS78Bst. En determinadas realizaciones, los anticuerpos anti-CTLA-4 descritos en esta memoria se producen en células de mamífero, tales como células CHO.

En una realización específica, los anticuerpos descritos en esta memoria o fragmentos de unión a antígeno de los mismos tienen un contenido reducido en fucosa o ningún contenido en fucosa. Anticuerpos de este tipo se pueden producir utilizando técnicas conocidas por un experto en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden expresarse en células deficientes o que carecen de la capacidad de fucosilar. En un ejemplo específico, líneas celulares con una inactivación de ambos alelos de α 1,6-fucosiltransferasa se pueden utilizar para producir anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos con un contenido reducido de fucosa. El sistema Potelligent® (Lonza) es un ejemplo

de un sistema de este tipo que puede utilizarse para producir anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos con un contenido reducido en fucosa.

Para la producción a largo plazo, de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se pueden generar células de expresión estables. Por ejemplo, se pueden diseñar líneas celulares que expresen de manera estable un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En realizaciones específicas, una célula proporcionada en esta memoria expresa de manera estable una región variable de la cadena ligera/cadena ligera y una región variable de la cadena pesada/cadena pesada que se asocian para formar un anticuerpo descrito en esta memoria o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

En determinados aspectos, en lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células huésped pueden transformarse con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados (*p. ej.*, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, *etc.*), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN/polinucleótido extraño, se puede permitir que las células manipuladas crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambien a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren establemente el plásmido en sus cromosomas y crezcan para formar focos que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede utilizarse ventajosamente para manipular líneas celulares que expresen un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria o un fragmento del mismo. Líneas celulares manipuladas de este tipo pueden ser particularmente útiles en el rastreo y evaluación de composiciones que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Se puede utilizar un cierto número de sistemas de selección, que incluyen la timidina quinasa del virus del herpes simplex (Wigler M et al., (1977) Cell 11(1): 223-32), hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska EH y Szybalski W (1962) PNAS 48(12): 2026-2034) y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy I et al., (1980) Cell 22(3): 817-23) genes en células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Además, la resistencia a los antimetabolitos se puede utilizar como base de selección para los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia a metotrexato (Wigler M et al., (1980) PNAS 77(6): 3567-70; O'Hare K et al., (1981) PNAS 78: 1527-31); *gpt*, que confiere resistencia a ácido micofenólico (Mulligan RC y Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-6); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu GY y Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596; Mulligan RC (1993) Science 260: 926-932; y Morgan RA y Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217; Nabel GJ & Felgner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-5); e *hygro*, que confiere resistencia a higromicina (Santerre RF et al., (1984) Gene 30(1-3): 147-56). Métodos comúnmente conocidos en la técnica de la tecnología de ADN recombinante se pueden aplicar rutinariamente para seleccionar el clon recombinante deseado y métodos de este tipo se describen, por ejemplo, en Ausubel FM et al., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli NC et al., (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbère-Garapin F et al., (1981) J Mol Biol 150: 1-14.

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

La célula huésped puede co-transfectarse con dos o más vectores de expresión descritos en esta memoria, codificando el primer vector un polipéptido derivado de la cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Las células huésped pueden co-transfectarse con diferentes cantidades de los dos o más vectores de expresión. Por ejemplo, las células huésped pueden transfectarse con una cualquiera de las siguientes relaciones de un primer vector de expresión y un segundo vector de expresión: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 o 1:50.

Alternativamente, puede utilizarse un único vector que codifica, y es capaz de expresar, tanto polipéptidos de cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debería colocarse delante de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre de tóxicos (Proudfoot NJ (1986) Nature 322: 562-565; y Köhler G (1980) PNAS 77: 2197-2199). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico. El vector de expresión puede ser monocistrónico o multicistrónico. Una construcción de ácido nucleico multicistrónico puede codificar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más, o en el intervalo de 2-5, 5-10 o 10-20 secuencias de genes/nucleótidos. Por ejemplo, una construcción de ácido nucleico bicistrónico puede comprender, en el siguiente orden un promotor, un primer gen (*p. ej.*, la cadena pesada de un anticuerpo descrito en esta memoria) y un segundo gen (*p. ej.*, la cadena ligera de un anticuerpo descrito en esta memoria). En un vector de expresión de este tipo, la transcripción de ambos genes puede ser impulsada por el promotor, mientras que la traducción del ARNm del primer gen puede ser por un mecanismo de escaneo dependiente del remate y la traducción del ARNm del segundo gen puede ser por un mecanismo independiente del remate, *p. ej.*, por un IRES.

Una vez que una molécula de anticuerpo descrita en esta memoria se ha producido por expresión recombinante, se puede purificar por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (*p. ej.*, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico detrás de la proteína A y la cromatografía en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos descritos en esta memoria pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos descritos en esta memoria o conocidos de otro modo en la técnica para facilitar la purificación.

En realizaciones específicas, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en esta memoria se aísla o purifica. Generalmente, un anticuerpo aislado es uno que está sustancialmente libre de otros anticuerpos con especificidades antigénicas diferentes a las del anticuerpo aislado. Por ejemplo, en una realización particular, una preparación de un anticuerpo descrito en esta memoria está sustancialmente libre de material celular y/o precursores químicos. El lenguaje "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un anticuerpo en las que el anticuerpo se separa de componentes celulares de las células de las que se aísla o se produce de forma recombinante. Por lo tanto, un anticuerpo que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de anticuerpos que tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% o 0,1% (en peso seco) de heterólogo proteína heteróloga (a la que también se alude en esta memoria como "proteína contaminante") y/o variantes de un anticuerpo, por ejemplo, diferentes formas modificadas post-traduccionales de un anticuerpo u otras versiones diferentes de un anticuerpo (*p. ej.*, fragmentos de anticuerpos). Cuando el anticuerpo se produce de forma recombinante, generalmente también está sustancialmente libre de medio de cultivo, es *decir*, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5% o 0,1% del volumen de la preparación de proteínas. Cuando el anticuerpo se produce por síntesis química, generalmente está sustancialmente libre de precursores químicos u otros agentes químicos, es *decir*, está separado de los precursores químicos u otros agentes químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, preparaciones de este tipo del anticuerpo tienen menos de aproximadamente 30%, 20%, 10% o 5% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del anticuerpo de interés. En una realización específica, los anticuerpos descritos en esta memoria se aíslan o purifican.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a CTLA-4 (*p. ej.*, CTLA-4 humana) pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, por ejemplo, mediante síntesis química o mediante técnicas de expresión recombinante. Los métodos descritos en esta memoria emplean, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales en biología molecular, microbiología, análisis genético, ADN recombinante, química orgánica, bioquímica, PCR, síntesis y modificación de oligonucleótidos, hibridación de ácidos nucleicos y campos relacionados dentro de la habilidad de la técnica. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en las referencias citadas en esta memoria y se explican completamente en la bibliografía. Véase, *p. ej.*, Maniatis T et al., (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B et al., (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

En una realización específica, un anticuerpo descrito en esta memoria es un anticuerpo (*p. ej.*, anticuerpo recombinante) preparado, expresado, creado o aislado por cualquier medio que implique la creación, *p. ej.*, vía síntesis, manipulación genética de secuencias de ADN. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo comprende secuencias (*p. ej.*, secuencias de ADN o secuencias de aminoácidos) que no existen de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos de un animal o mamífero (*p. ej.*, ser humano) *in vivo*.

En un aspecto, en esta memoria se proporciona un método para fabricar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CTLA-4 (*p. ej.*, CTLA-4 humana) que comprende cultivar una célula o célula huésped descrita en esta memoria. En un aspecto determinado, se proporciona en esta memoria un método para fabricar un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a CTLA-4 (*p. ej.*, CTLA-4 humana) que comprende expresar (*p. ej.*, expresar de forma recombinante) el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo utilizando una célula o célula huésped descrita en esta memoria (*p. ej.*, una célula o una célula huésped que comprende polinucleótidos que codifican un anticuerpo descrito en esta memoria). En una realización particular, la célula es una célula aislada. En una realización particular, los polinucleótidos exógenos han sido introducidos en la célula. En una realización particular, el método comprende, además, la etapa de purificar el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo obtenido de la célula o célula huésped. Preferiblemente, el método se realiza *in vitro*.

Métodos para producir anticuerpos policlonales son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el Capítulo 11 en: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5ª Ed., Ausubel FM et al., eds., John Wiley and Sons, Nueva York).

Anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen el uso de hibridoma, tecnologías recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden producirse utilizando técnicas de hibridoma que incluyen

las conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow E y Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling GJ et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981). La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en esta memoria, no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. Por ejemplo los anticuerpos monoclonales se pueden producir de forma recombinante a partir de células huésped que expresan exógenamente un anticuerpo descrito en esta memoria o un fragmento del mismo, por ejemplo, la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo de este tipo.

En realizaciones específicas, un "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en esta memoria, es un anticuerpo producido por una sola célula (*p. ej.*, hibridoma o célula huésped que produce un anticuerpo recombinante), en donde el anticuerpo se une específicamente a CTLA-4 (*p. ej.*, CTLA-4 humana) tal como se determina, *p. ej.*, mediante ELISA u otro ensayo de unión a antígeno o de unión competitiva conocido en la técnica o en los ejemplos proporcionados en esta memoria. En realizaciones particulares, un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. En determinadas realizaciones, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo monovalente o un anticuerpo multivalente (*p. ej.*, bivalente). En realizaciones particulares, un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo mono-específico o multi-específico (*p. ej.*, anticuerpo biespecífico). Anticuerpos monoclonales descritos en esta memoria pueden, por ejemplo, hacerse mediante el método de hibridoma, tal como se describe en Kohler G y Milstein C (1975) *Nature* 256: 495 o pueden, *p. ej.*, aislarse de fagotecas utilizando las técnicas como se describe en esta memoria, por ejemplo. Otros métodos para la preparación de líneas celulares clonales y de anticuerpos monoclonales expresados de ese modo son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el Capítulo 11 en: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., *supra*).

Métodos para producir y rastrear anticuerpos específicos utilizando tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como una oveja, cabra, conejo, rata, hámster o mono macaco, se inmuniza para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína (*p. ej.*, CTLA-4 (*p. ej.*, humana)) utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Luego, los linfocitos se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Adicionalmente, se puede utilizar una técnica RIMMS (inmunización repetitiva en múltiples sitios) para inmunizar a un animal (Kilpatrick KE et al., (1997) *Hybridoma* 16:381-9).

En algunos aspectos, los ratones (u otros animales, tales como ratas, burros, cerdos, ovejas, hámster o perros) pueden inmunizarse con un antígeno (*p. ej.*, CTLA-4 (*p. ej.*, CTLA-4 humana)) y una vez que se detecta una respuesta inmune, *p. ej.*, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero de ratón, se recoge el bazo de ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan luego mediante técnicas bien conocidas a cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponibles de American Type Culture Collection (ATCC®) (Manassas, VA), para formar hibridomas. Los hibridomas se seleccionan y clonan por dilución limitada. En determinadas realizaciones, los ganglios linfáticos de los ratones inmunizados se recogen y se fusionan con células de mieloma NS0.

Las células de hibridoma, así preparadas, se siembran y hacen crecer en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parental carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Aspectos específicos emplean células de mieloma que se fusionan eficientemente, soportan la producción estable de anticuerpos de alto nivel por parte de células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Entre estas líneas celulares de mieloma se encuentran las líneas de mieloma murino, tal como la línea celular NS0 o las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, EE.UU., y células SP-2 o X63-Ag8.653 disponibles de American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU. Líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma humano de ratón también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor D (1984) *J Immunol* 133: 3001-5; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, págs. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma se someten a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra CTLA-4 (*p. ej.*, CTLA-4 humana). La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo por inmuoabsorción ligado a enzima (ELISA).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse limitando los procedimientos de dilución y cultivarlos mediante métodos estándares (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, *supra*). Medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI 1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Anticuerpos descritos en esta memoria incluyen fragmentos de anticuerpos que reconocen CTLA-4 específica (*p. ej.*, CTLA-4 humana) y pueden generarse mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')₂ descritos en esta memoria pueden producirse mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Un fragmento Fab corresponde a uno de los dos brazos idénticos de una molécula de anticuerpo y contiene la cadena ligera completa emparejada con los dominios VH y CH1 de la cadena pesada. Un fragmento F(ab')₂ contiene los dos brazos de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo unida por enlaces disulfuro en la región bisagra.

Además, los anticuerpos descritos en esta memoria o los fragmentos de unión a antígeno de los mismos también pueden generarse utilizando diversos métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los métodos de presentación de fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se muestran en la superficie de las partículas de fago que llevan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL se amplifican a partir de colecciones de ADNc de animales (*p. ej.*, colecciones de ADNc humano o murino de tejidos afectados). Los ADN que codifica los dominios VH y VL se recombinan junto con un enlazador scFv por PCR y se clona en un vector fagémido. El vector se electropora en *E. coli* y la *E. coli* infecta con fago auxiliar. Los fagos utilizados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen fd y M13, y los dominios VH y VL se fusionan habitualmente de manera recombinante con el gen del fago III o el gen VIII. Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une a un antígeno particular pueden seleccionarse o identificarse con un antígeno, *p. ej.*, utilizando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Ejemplos de métodos de presentación en fagos que pueden utilizarse para preparar los anticuerpos descritos en esta memoria incluyen los descritos en Brinkman U et al., (1995) J Immunol Methods 182: 41-50; Ames RS et al., (1995) J Immunol Methods 184: 177-186; Kettleborough CA et al., (1994) Eur J Immunol 24: 952-958; Persic L et al., (1997) Gene 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) Advan Immunol 57: 191-280; Solicitud PCT N° PCT/GB91/001134; Publicaciones Internacionales N° WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, and WO 97/13844; y Patentes de EE.UU. N° 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743 y 5,969,108.

Tal como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones codificantes de anticuerpos del fago pueden aislarse y utilizarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y pueden expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levaduras y bacterias, *p. ej.*, tal como se describe más adelante. Técnicas para producir de forma recombinante fragmentos de anticuerpos tales como los fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también se pueden emplear utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la publicación PCT N° WO 92/22324; Mullinax RL et al., (1992) BioTechniques 12(6): 864-9; Sawai H et al., (1995) Am J Reprod Immunol 34: 26-34; y Better M et al., (1988) Science 240: 1041-1043.

En determinadas realizaciones, para generar anticuerpos completos, pueden utilizarse cebadores de PCR que incluyen secuencias de nucleótidos VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia flanqueante para proteger el sitio de restricción para amplificar las secuencias VH o VL de un molde, *p. ej.*, clones de scFv. Utilizando técnicas de clonación conocidas por los expertos en la técnica, los dominios VH amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante de VH, y los dominios VL amplificados por PCR pueden clonarse en vectores que expresan una región constante de VL, *p. ej.*, regiones constantes kappa o lambda humanas. Los dominios VH y VL también se pueden clonar en un vector que expresa las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión de la cadena pesada y los vectores de conversión de la cadena ligera se co-transfectan luego en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud completa, *p. ej.*, IgG, utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede contener una región variable de un anticuerpo monoclonal de ratón o rata fusionado a una región constante de un anticuerpo humano. Métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véase, *p. ej.*, Morrison SL (1985) Science 229: 1202-7; Oi VT y Morrison SL (1986) BioTechniques 4: 214-221; Gillies SD et al., (1989) J Immunol Methods 125: 191-202; y Patentes de EE.UU. N° 5.807.715, 4.816.567, 4.816.397 y 6.331.415.

Un anticuerpo humanizado es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región marco que tiene sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y CDR que tienen sustancialmente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana (*p. ej.*, una inmunoglobulina murina). En realizaciones particulares, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3 y CH4 de la cadena pesada. Se puede seleccionar un anticuerpo humanizado de cualquier clase de inmunoglobulinas, incluyendo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, que incluye IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄. Los anticuerpos humanizados pueden producirse utilizando una diversidad de técnicas

conocidas en la técnica de injerto de CDR (Patente Europea Nº EP 239400; Publicación Internacional Nº WO 91/09967; y Patentes de Estados Unidos Nº 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), recubrimiento o revestimiento (Patentes europeas Nº. EP 592106 y EP 519596; Padlan EA (1991) Mol Immunol 28(4/5): 489-498; Studnicka GM et al., (1994) Prot Engineering 7(6): 805-814; y Roguska MA et al., (1994) PNAS 91: 969-973), reordenamiento de la cadena (Patente de EE.UU. Nº 5.565.332), y técnicas descritas en, *p. ej.*, la Pat. de EE.UU. Nº 6.407.213, Pat. de EE.UU. Nº. 5.766.886, Publicación Internacional Nº WO 93/17105; Tan P et al., (2002) J Immunol 169: 1119-25; Caldas C et al., (2000) Protein Eng. 13(5): 353-60; Morea V et al., (2000) Methods 20(3): 267-79; Baca M et al., (1997) J Biol Chem 272(16): 10678-84; Roguska MA et al., (1996) Protein Eng 9(10): 895 904; Couto JR et al., (1995) Cancer Res. 55 (23 Sup): 5973s-5977s; Couto JR et al., (1995) Cancer Res 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) Gene 150(2): 409-10 y Pedersen JT et al., (1994) J Mol Biol 235(3): 959-73. Véase también la Publicación de Sollicitud de EE.UU. Nº US 2005/0042664 A1 (24 de febrero de 2005).

Se han descrito métodos para hacer anticuerpos multiespecíficos (*p. ej.*, anticuerpos biespecíficos), véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nº 7.951.917; 7.183.076; 8.227.577; 5.837.242; 5.989.830; 5.869.620; 6.132.992 y 8.586.713.

Anticuerpos de dominio único, por ejemplo, anticuerpos que carecen de las cadenas ligeras, pueden producirse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Véanse Riechmann L y Muyldermans S (1999) J Immunol 231: 25-38; Nuttall SD et al., (2000) Curr Pharm Biotechnol 1(3): 253-263; Muyldermans S, (2001) J Biotechnol 74(4): 277-302; Patente de EE.UU. Nº 6.005.079; y las Publicaciones Internacionales Nº. WO 94/04678, WO 94/25591 y WO 01/44301.

Además, los anticuerpos que se unen específicamente a un antígeno CTLA-4 pueden, a su vez, utilizarse para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imitan" un antígeno utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. (Véase, *p. ej.*, Greenspan NS y Bona CA (1989) FASEB J 7(5): 437-444; y Nissinoff A (1991) J Immunol 147(8): 2429-2438).

En aspectos particulares, un anticuerpo descrito en esta memoria que se une al mismo epítipo de CTLA-4 (*p. ej.*, CTLA-4 humana) que un anticuerpo anti-CTLA-4 descrito en esta memoria, es un anticuerpo humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En aspectos particulares, un anticuerpo descrito en esta memoria, que bloquea de forma competitiva (*p. ej.*, de una manera dependiente de la dosis) uno cualquiera de los anticuerpos descritos en esta memoria, de la unión a CTLA-4 (*p. ej.*, CTLA-4 humana), es un anticuerpo humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Anticuerpos humanos se pueden producir utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden utilizarse ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. En particular, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humana pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, la región variable humana, la región constante y la región de diversidad pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes humanos de cadena pesada y ligera. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana por recombinación homóloga. En particular, la delección homocigota de la región J_H evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían entonces para producir descendientes homocigotos que expresan anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos son inmunizados de manera normal con un antígeno seleccionado, *p. ej.*, todo o una parte de un antígeno (*p. ej.*, CTLA-4). Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse de ratones transgénicos inmunizados utilizando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de células B, y posteriormente experimentan un cambio de clase y una mutación somática. Por lo tanto, utilizando una técnica de este tipo, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg N y Huszar D (1995) Int Rev Immunol 13:65-93. Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir este tipo de anticuerpos, véanse, *p. ej.*, las Publicaciones Internacionales Nº. WO 98/24893, WO 96/34096 y WO 96/33735; y las Patentes de EE.UU. Nº 5.413.923, 5.625.126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318 y 5.939.598. Ejemplos de ratones capaces de producir anticuerpos humanos incluyen Xenomouse™ (Abgenix, Inc. ; Patentes de EE.UU. Nº. 6.075.181 y 6.150.184), HuAb-Mouse™ (Medarex, Inc./Gen Pharm; Patentes de EE.UU. Nº 5.545.806 y 5.569, 825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) y KM Mouse™ (Medarex/Kirin).

Anticuerpos humanos que se unen específicamente a CTLA-4 (*p. ej.*, CTLA-4 humana) pueden prepararse mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica que incluyen métodos de presentación en fagos arriba descritos, utilizando colecciones de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse también las Patentes de EE.UU. Nº 4.444.887, 4.716.111 y 5.885.793; y las Publicaciones Internacionales Nº WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741.

En algunas realizaciones, los anticuerpos humanos pueden producirse utilizando hibridomas de ratón-ser humano. Por ejemplo, linfocitos de la sangre periférica humana transformados con el virus de Epstein-Barr (EBV) pueden fusionarse con células de mieloma de ratón para producir hibridomas de ratón-humano que secretan anticuerpos monoclonales humanos, y estos hibridomas de ratón-ser humano pueden rastrearse para determinar cuáles secretan anticuerpos monoclonales humanos. que se unen específicamente a un antígeno diana (*p. ej.*, CTLA-4 (*p. ej.*, CTLA-

4 humana)). Métodos de este tipo son conocidos y se describen en la técnica, véase, *p. ej.*, Shinmoto H et al., (2004) Cytotechnology 46: 19-23; Naganawa Y et al., (2005) Human Antibodies 14: 27-31.

5.6 Kits

También se proporcionan kits que comprenden uno o más anticuerpos descritos en esta memoria, o composición farmacéutica o conjugados de los mismos. En una realización específica, en esta memoria se proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria, tales como uno o más anticuerpos proporcionados en esta memoria o un fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, los kits contienen una composición farmacéutica descrita en esta memoria y cualquier agente profiláctico o terapéutico, tales como los descritos en esta memoria. En determinadas realizaciones, los kits pueden contener un mitógeno de células T, tal como, *p. ej.*, fitohemaglutinina (PHA) y/o miristato-acetato de forbol (PMA), o un anticuerpo estimulante del complejo TCR, tal como un anticuerpo anti-CD3 y anticuerpo anti-CD28. Opcionalmente asociado con dicho o dichos recipientes puede haber una notificación en la forma prescrita por una Agencia Gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, notificación que refleja la aprobación de la Agencia para la fabricación, el uso o la venta para la administración humana.

También se proporcionan kits que se pueden utilizar en los métodos anteriores. En una realización, un kit comprende un anticuerpo descrito en esta memoria, preferiblemente un anticuerpo purificado, en uno o más recipientes. En una realización específica, los kits descritos en esta memoria contienen un antígeno CTLA-4 sustancialmente aislado (*p. ej.*, CTLA-4 humana) como control. En otra realización específica, los kits descritos en esta memoria comprenden, además, un anticuerpo de control que no reacciona con un antígeno CTLA-4. En otra realización específica, los kits descritos en esta memoria contienen uno o más elementos para detectar la unión de un anticuerpo a un antígeno CTLA-4 (*p. ej.*, el anticuerpo puede conjugarse con un sustrato detectable tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radiactivo o un compuesto luminiscente, o un segundo anticuerpo que reconoce el primer anticuerpo puede conjugarse con un sustrato detectable). En realizaciones específicas, un kit proporcionado en esta memoria puede incluir un antígeno CTLA-4 producido de forma recombinante o sintetizado químicamente. El antígeno CTLA-4 proporcionado en el kit también se puede unir a un soporte sólido. En una realización más específica, los medios de detección del kit arriba descrito incluyen un soporte sólido al que se une un antígeno CTLA-4. Un kit de este tipo también puede incluir un anticuerpo antihumano o un anticuerpo anti-ratón/rata marcado con informador no fijado. En esta realización, la unión del anticuerpo al antígeno CTLA-4 se puede detectar mediante la unión de dicho anticuerpo marcado con informador.

Se proporciona el uso de un kit para el ensayo *in vitro* y/o la detección de CTLA-4 humana en una muestra biológica

6. EJEMPLOS

Los ejemplos de esta Sección (*es decir*, la Sección 6) se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

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

Este ejemplo describe la caracterización de anticuerpos que se unen a CTLA-4 humana. En particular, un anticuerpo designado AGEN1884 se caracterizó en un cierto número de ensayos descritos a continuación. El anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. El anticuerpo AGEN1884 es un anticuerpo IgG₁ humano que contiene una Sustitución de T109S (*es decir*, sustitución de treonina con serina en la posición 109 con respecto a la secuencia Fc de tipo salvaje), numerada de acuerdo con Kabat, en el dominio constante de la cadena ligera, que facilita la clonación de la región variable en marco a la región constante. Esta mutación es una modificación conservadora que no afecta a la unión o función del anticuerpo. También se generó la contraparte de tipo salvaje, denominada AGEN1884w, que contiene una treonina en la posición 109, numerada de acuerdo con Kabat. El anticuerpo AGEN1884w es un anticuerpo IgG₁ humano que comprende una cadena pesada de SEQ ID NO: 93 y una cadena ligera de SEQ ID NO: 13.

6.1.1 Análisis cinético por resonancia de plasmón de superficie

La resonancia de plasmón de superficie se utilizó para determinar la afinidad del anticuerpo anti-CTLA-4 AGEN1884 y un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia (sistema potenciado en sensibilidad BIAcore® T100/T200 (GE Healthcare) y un ensayo de captura Fab). Todas las interacciones se analizaron a 25°C utilizando 1xDPBS (PAA, H15-002) más P20 (0,05%, Pierce, 28320) como tampón de desarrollo. Los anticuerpos anti-CTLA-4 (8 µg/ml en tampón de desarrollo) se capturaron en la superficie del chip de un chip sensor CM5 (GE Healthcare, Serie S CM5, BR-1005-30) a través de un anticuerpo Fab anti-humano inmovilizado (GE Healthcare, Fab Capture Kit, 28958325). Para detectar interacciones inespecíficas del antígeno CTLA-4, la captura de anticuerpos solo se realizó en la celda de flujo 2, mientras que en la celda de flujo 1 solo se inmovilizó el anticuerpo de captura. Después de la captura de los anticuerpos anti-CTLA-4, los antígenos CTLA-4 se ejecutaron a través de ambas celdas de flujo en cantidades diferentes. Específicamente, CTLA-4-Fc humana recombinante (R&D Systems, nº 7268-CT), CTLA-4 humana recombinante (Sino Biological, nº 11159-H08H), CTLA-4-Fc de cynomolgus recombinante (Sino Biological, nº 90213-C02H) y la CTLA-4 de cynomolgus recombinante (Sino Biological, nº 90213-C08H) se desarrollaron a razón de 100

nM, 25 nM y 6,25 nM; y CTLA-4-Fc de ratón recombinante (R&D, nº 434-CT), CTLA-4-Fc de rata recombinante (Sino Biological, nº 81069-R02H) y CTLA-4 de rata recombinante (Sino Biological, nº 81069-R08H) se desarrollaron a razón de 400 nM, 100 nM y 25 nM. También se incluyó una curva en blanco (solo tampón de desarrollo) en cada uno de los desarrollos. La asociación se desarrolló durante 90 segundos y la disociación durante 600 segundos con un caudal de 10 µl/min. Después de cada uno de los desarrollos, se realizó una etapa de regeneración con Glicina 10 mM pH 2,0 (GE Healthcare, BR-1003-55) durante 60 segundos con 30 µl/min. Las curvas de unión se evaluaron utilizando el software de evaluación BIAcore® T200 versión 2.0.1 aplicando un modelo Langmuir 1: 1 con ajuste global de Rmax. A partir de estos valores, se calcularon las afinidades (K_D) de AGEN1884 y el anticuerpo anti-CTLA-4 de referencia para diversos antígenos y se muestran en la Figura 1A. La CTLA-4 monomérica recombinante de cynomolgus, CTLA-4-Fc de ratón y CTLA-4 de rata monomérica utilizadas en este estudio fracasaron en la evaluación del control de calidad. La unión de los anticuerpos anti-CTLA-4 a la proteína CTLA-4-Fc de ratón recombinante, que mostró una agregación del 50%, probablemente se debió a interacciones inespecíficas. El análisis de resonancia de plasmón de superficie se repitió más tarde dos veces utilizando CTLA-4-Fc de ratón recombinante (Sino Biological, nº 81069-R02H) que pasó una evaluación del control de calidad a 360 nM, 120 nM, 40 nM y 13,3 nM para AGEN1884w. AGEN1884w no mostró unión detectable alguna a CTLA-4 de ratón.

6.1.2 Unión de anticuerpos a células que sobre-expresan CTLA-4

Células Jurkat que sobre-expresan CTLA-4 humana (Promega) se mantuvieron en RPMI1640 (Life Technologies) que contenía FBS al 10% (Gemini Bio Products), 100 µg/ml de higromicina B (Gibco) y 500 µg/ml de G418 (Promega). Antes de teñir con anticuerpos, las células se lavaron una vez en tampón FACS (PBS con FBS al 2%). Se añadieron diluciones en serie de AGEN1884w, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y un control del isotipo IgG₁ que comienza a 10 µg/ml para duplicar los pocillos en placas de fondo redondo de 96 pocillos en un volumen de 100 µl y se incubaron durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron tres veces con 150 µl de tampón FACS y se tiñeron con 100 µl de tampón FACS que contenía 0,25 µl de anticuerpo kappa anti-humano de ratón conjugado con PE (Invitrogen) durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron entonces dos veces y se volvieron a suspender en 100 µl de tampón FACS. Las muestras fueron adquiridas en un LSRFortessa (BD Biosciences). Las intensidades medias de fluorescencia (MFI) se analizaron con el software FlowJo (FlowJo, LLC) y se trazaron utilizando Prism 6 (Software GraphPad). Como se muestra en la Figura 1B, el anticuerpo AGEN1884w unido al CTLA-4 humana se expresó en la superficie de las células Jurkat.

6.1.3 Ensayo de selectividad de anticuerpos CTLA-4

La selectividad de AGEN1884 para CTLA-4 se evaluó frente a otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas utilizando tecnología de matriz de suspensión como un ensayo multiplex. Un cierto número de miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas se acoplaron químicamente a microesferas Luminex® utilizando química estándar de éster NHS. Materiales purificados de AGEN1884, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y un control del isotipo IgG₁ se diluyeron en tampón de ensayo (Roche 11112589001) a 10 ng/ml, 100 ng/ml y 1000 ng/ml. Brevemente, se incubaron 25 µl de cada una de las diluciones en la oscuridad (20°C, 650 rpm) con 1500 microesferas Luminex® en 5 µl de tampón de ensayo durante 1 hora en placas de filtro de 96 semi-pocillos (Millipore, MABVN1250). Las microesferas Luminex® se acoplaron con CTLA-4-Fc recombinante humana (R&D Systems, nº 7268-CT), CTLA-4-Fc recombinante de cynomolgus (Sino Biological, nº 90213-C02H), rhCD28-Fc (R&D, nº 342-CD-200), rhICOS-Fc (R&D, nº 169-CS-050), rhBTLA-Fc (Sino Biological, nº 11896-H02H), rhPD-1-Fc (R&D Systems, nº 1086-PD) o PD-1-Fc recombinante de cynomolgus (producido internamente) vía acoplamiento de amina con la superficie de la perla de COOH. Las curvas de calibración se generaron utilizando duplicados de 25 µl de una IgG₁ humana estándar (Sigma, 15154) con series de dilución 1:3 (0,08-540 ng/ml). La detección se llevó a cabo utilizando 60 µl de F(ab)₂ de IgG anti-humana de cabra marcada con R-PE (2,5 µg/ml; JIR 109-116-098, kit de conjugación de anticuerpos AbD Serotec Rapid RPE, LNK022RPE) y otra hora de tiempo de incubación (20°C, 650 rpm). Las placas se analizaron utilizando un sistema Luminex® 200 (Millipore). Se contaron un total de 100 perlas por pocillo en un volumen de muestra de 48 µl. Los valores de PE MFI se utilizaron para determinar la unión específica o inespecífica a las proteínas recombinantes arriba mencionadas.

Como se muestra en las Figuras 1C y 1D, el anticuerpo AGEN1884 demostró una unión específica a CTLA-4 humana y de cynomolgus. No se observó una unión significativa a otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas enumerados a las concentraciones testadas.

6.1.4 Unión de anticuerpos a CTLA-4 expresada por células T activadas

A continuación, se examinó la unión de AGEN1884w a CTLA-4 expresado en la superficie de las células T humanas activadas. PBMC humanas aisladas mediante separación por densidad de gradiente de Ficoll de capas leucocitarias de donantes sanos (Research Blood Components, LLC) se enriquecieron para células T CD4⁺ intactas utilizando perlas magnéticas (Stemcell Technologies). La población enriquecida de células T CD4⁺ se volvió a suspender luego en medio RPMI1640 complementado con suero AB humano al 10% (Sigma) a 1×10^6 /ml. Se sembraron 1×10^5 células en 100 µl en cada uno de los pocillos de placas de 96 pocillos de fondo plano, previamente recubiertas con un anticuerpo anti-CD3 (3 µg/ml, BD Biosciences) y un anticuerpo anti-CD28 (10 µg/ml, BD Biosciences) y cultivadas a 37°C y 5% de CO₂. El día 5, las células se agruparon y contaron utilizando el analizador Muse Cell Analyzer (EMD Millipore). 50.000 células se tiñeron con 100 µl de AGEN1884w, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y un

control del isotipo IgG₁ diluido en serie a partir de 10 µg/ml en placas de 96 pocillos de fondo redondo durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron tres veces con 150 µl de tampón FACS y se tiñeron con 100 µl de tampón FACS que contenía 0,25 µl de anticuerpo kappa anti-humano de ratón marcado con PE (Invitrogen) y 1 µl de APC-CD4 (BD Bioscience) durante 30 minutos a 4°C. Luego se lavaron las células dos veces y se volvieron a suspender en 100 µl de tampón FACS. Las muestras se adquirieron en un sistema FACSCanto II (BD Biosciences). Las intensidades medias de fluorescencia (MFI) de PE en células T CD4⁺ se analizaron utilizando el software FlowJo (FlowJo, LLC). Tal como se muestra en la Figura 2A, AGEN1884w se unió a CTLA-4 expresada en la superficie de las células T CD4⁺ humanas activadas.

Las características de unión del anticuerpo AGEN1884 a CTLA-4 de cynomolgus (*Macaca fascicularis*) se analizaron mediante un análisis de citometría de flujo. PBMC de Cynomolgus (Biomedical Primate Research Center, Países Bajos) aisladas mediante gradiente de ficoll se activaron utilizando 8 µg/ml de anticuerpos anti-CD3 (BD, 557052) y 0,1 µg/ml de anticuerpos anti-CD28 unidos a placa (eBioscience, Cat. 16-0289- 85) en presencia de 50 U/ml de IL-2 (BioLegend, 589106) durante 3 días en medio RPMI-1640 complementado con suero bovino fetal al 10%, HEPES 10 mM y IX Pen/Strep-Glutamine a 37°C y 5% de CO₂. Después de la activación, las células se incubaron con un anticuerpo anti-CD8a (eBioscience, 9043-0087-120) diluido 1:100 en tampón FACS (PBS con FBS al 2%) durante 30 minutos a 4°C. Las células se lavaron luego con tampón FACS dos veces y se aplicaron al procedimiento Cytotfix/Cytoperm del kit de BD Bioscience (51-2090KZ) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Diluciones seriadas de 1:3 de 9 a 0,037 µg/ml de AGEN1884, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y un control del isotipo IgG₁ se aplicaron a las células. Las muestras se suspendieron en 200 µl de tampón FACS y se analizaron utilizando el citómetro de flujo FACS Diva (BD Biosciences). Cuando se utilizó para la tinción intracelular, el anticuerpo AGEN1884 anti-CTLA-4 mostró unión a las células T CD8⁺ de cynomolgus activadas (Figura 2B).

Además, las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de ser humano, mono cynomolgus (Indochina), rata o ratón se dividió en partes alícuotas en una placa de cultivo de tejido de fondo redondo de 96 pocillos (1 x 10⁵ células/pocillo) y se estimularon durante 4 días en RPMI-1640 complementado con suero de bovino fetal al 10%, HEPES 15 mM, 100 UI/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de IL-2 (PeproTech) y 1 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA) (Roche) a 37°C y 5% de CO₂. Después de la estimulación, las células se lavaron y se añadió suero AB humano inactivado por calor al 5% (Sigma-Aldrich) para bloquear los receptores Fc y evitar la unión no específica de anticuerpos. Las células se lavaron nuevamente y se volvieron a suspender en 100 µl de un anticuerpo anti-CD4 conjugado con APC diluido (clon OKT4, GK15 o W3/25; BioLegend). Después de incubación durante 45 minutos en la oscuridad, las células se lavaron tres veces y se permeabilizaron utilizando un conjunto de tampón de tinción de factor de transcripción/FoxP3 (eBioscience) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la permeabilización, las células se incubaron con diluciones en serie de AGEN1884w marcado con fluorescencia (Pacific Blue™) o un anticuerpo de control del isotipo que varía de 0,00003 µg/ml a 10 µg/ml durante 45 minutos a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron dos veces antes del análisis de citometría de flujo utilizando un aparato LSRFortessa™ de Becton Dickinson. Los datos se analizaron con el software FlowJo (Versión 10). Tal como se muestra en la Figura 2C, el anticuerpo AGEN1884w se unió a células T CD4⁺ humanas y de cynomolgus estimuladas con PHA, pero no a células T de rata o ratón.

6.1.5 Actividad de bloqueo de ligando

Para determinar si los anticuerpos anti-CTLA-4 bloquean la unión de ligandos CD80 y CD86, se realizó una configuración de ensayo de clasificación utilizando tecnología de matriz de suspensión (el esquema se muestra en la Figura 3A). Se añadieron 1200 perlas Luminex® en 5 µl de tampón de ensayo (Luminex Corp, nº 14 LC10014-01) a cada uno de los pocillos de placas de media área de 96 pocillos (Corning, Inc., 3884). Las perlas se acoplaron con el antígeno CTLA-4 (rhCTLA-4-Fc, R&D, nº 7268-CT) vía el acoplamiento de amina con la superficie de la perla de COOH. La reacción de acoplamiento se realizó utilizando 50 µg/ml de antígeno CTLA-4 y 1 x 10⁷ perlas Luminex por ml. La química estándar del éster de NHS se utilizó para formar enlaces de carbodiimida entre los grupos de amina primaria del antígeno y los grupos carboxilo en la superficie del cordón (libro de cocina Luminex Xmap, capítulo 3).

El acoplamiento de antígeno para proteínas es un procedimiento simple de carbodiimida en dos etapas durante el cual los grupos carboxilo de microesferas se activan primero con EDC (hidrocloruro de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida) en presencia de Sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) para formar un compuesto intermedio de sulfo-NHS-éster. El compuesto intermedio reactivo se reemplaza luego mediante reacción con la amina primaria de la molécula diana (anticuerpo, proteína o péptido) para formar un enlace amida covalente. Las perlas acopladas se incubaron con diferentes concentraciones de anticuerpos anti-CTLA-4 (concentraciones de 9000 ng/ml a 12 ng/ml en 25 µl de tampón de ensayo por pocillo antes de añadir las perlas) durante 1 hora a 20°C y 650 rpm. Los anticuerpos anti-CTLA-4 testados fueron AGEN1884, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y un anticuerpo IgG₁ de control del isotipo. Posteriormente, se añadieron 30 µl de CD80 marcado con R-PE (R&D Systems, nº 140-B1) o CD86 (R&D Systems, nº 141-B2) a una concentración de 1 nM a cada uno de los pocillo, dando un volumen total de los pocillos de 60 µl (1200 perlas por pocillo y una concentración final de 0,5 nM de CD80 o CD86 marcado). El marcaje del ligando se realizó internamente utilizando kits de marcaje R-PE (AbDSerotec, LYNX Rapid RPE kit de Conjugación de Anticuerpos LNK023RPE) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las placas se analizaron utilizando un sistema Luminex® 200 (Millipore). Se contaron 100 perlas por cada pocillo en un volumen de muestra de 50 µl. El potencial de bloqueo de ligando se calculó utilizando los valores de MFI de la señal no competida (100% de

unión) del control solo de ligando. Una señal detectable de PE indicó la unión del ligando al antígeno. AGEN1884 inhibe la unión de CD80 (Figura 3B) y CD86 (Figura 3C) para CTLA-4 con una CI_{50} estimado de 56 ng/ml.

A continuación, se examinó la capacidad de los anticuerpos anti-CTLA-4 de bloquear la unión de CD80-Fc recombinante y CD86-Fc a CTLA-4 expresada en la superficie celular. En resumen, células T que expresan CTLA-4 (Jurkat) se incubaron con concentraciones crecientes de AGEN1884w, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia o un anticuerpo de control del isotipo IgG₁ (0, 0,001, 0,004, 0,012, 0,037, 0,11, 0,33, 0,99 y 2,96 µg/ml), seguido de una concentración fija (0,625 µg/ml) de CD80-Fc o CD86-Fc marcado por fluorescencia. El porcentaje de células unidas por CD80-Fc o CD86-Fc se determinó por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 3D, AGEN1884w y un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia inhibía la unión de CD80-Fc y CD86-Fc a células Jurkat que expresan CTLA-4.

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

6.1.6 Efecto de anticuerpos anti-CTLA-4 en las células T humanas después de la estimulación con Enterotoxina A de Staphylococcus (SEA)

La actividad funcional de anticuerpos anti-CTLA-4 en células T humanas primarias se evaluó después de la estimulación con Enterotoxina A de Staphylococcus (SEA). PBMC crioconservadas (10⁵ células/pocillo) en RPMI1640 complementado con penicilina, estreptomycin y FBS al 10% (Hyclone) se añadieron a placas de superficie delta NUNC de 96 pocillos (NUNC™). Las células se cultivaron en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpos de 3,2, 16, 80, 400, 2000, 10000 y 50000 ng/ml y 100 ng/ml de SEA (Toxin Technologies) durante 5 días a 37°C, 5% de CO₂ y 97% de humedad. Los anticuerpos testados fueron AGEN1884w, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y un control del isotipo IgG₁. El sobrenadante clarificado se recogió y se almacenó a -80°C hasta el análisis. Los títulos de IL-2 se generaron por electroquimioluminiscencia (MSD).

Como se muestra en la Figura 4A, AGEN1884w incrementó la producción de IL-2 de células T en presencia de estimulación con SEA.

6.1.7 Efecto del anticuerpo anti-CTLA-4 en la línea celular informadora de IL-2-luciferasa

La actividad funcional del anticuerpo AGEN1884w anti-CTLA-4 se analizó adicionalmente utilizando un ensayo informador de IL-2-luciferasa. Brevemente, una línea de células T humanas (Jurkat) que expresaba CD28 de forma endógena fue manipulada para expresar constitutivamente CTLA-4 de la superficie celular y un gen informador de luciferasa dirigido por un promotor de IL-2. La línea celular diseñada por Jurkat se co-cultivó con una línea celular presentadora de antígeno (Raji) que expresaba CD80 y CD86. La activación del receptor de células T (TCR) (Señal 1) se logró con un anticuerpo anti-CD3 humano de ratón y un anticuerpo IgG (H + L) anti-ratón; de cabra y la señalización coestimuladora (Señal 2) se proporcionó en trans por CD80 y CD86 expresados en células Raji. La expresión de CD80 y CD86 en células Raji se confirmó mediante citometría de flujo (Figura 4B). La reticulación del TCR en la línea de células T Jurkat desencadenó la expresión de IL-2 que condujo a la producción de luciferasa, un marcador sustituto para la activación de células T. El co-cultivo de estas dos líneas celulares resultó en el compromiso del co-receptor inhibidor CTLA-4 (expresado en células Jurkat) con sus ligandos naturales CD80 y CD86 (expresados en células Raji) inhibiendo la activación de las células T, demostrada por la ausencia de la expresión de luciferasa. Esta inhibición se alivió con la adición de concentraciones crecientes de AGEN1884w (0 a 300 µg/ml) debido a que AGEN1884w bloquea la interacción de CTLA-4 con sus ligandos CD80 y CD86 y desplaza la interacción de estos ligandos con el co-receptor de células T coestimuladoras CD28. La expresión de luciferasa se cuantificó utilizando el reactivo Bio-Glo™ y los datos resultantes se utilizaron para determinar los valores de respuesta múltiple máxima (incremento múltiple con AGEN1884w en comparación con un anticuerpo de control del isotipo IgG₁).

Como se muestra en la Figura 4C, el anticuerpo AGEN1884w anti-CTLA-4 liberó de manera dependiente de la dosis la inhibición de las células T mediada por CTLA-4 en este ensayo informador de IL-2-luciferasa.

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

Se evaluó el potencial de AGEN1884w para mediar en la señalización directa de CTLA-4. Células T humanas que expresan CD3 primarias se aislaron de células mononucleares de la sangre periférica utilizando el kit de microperlas de células T Pan Miltenyi y se cultivaron con un anticuerpo anti-CD3 unido a placa (clon SP34, 10 µg/ml) para activar la señalización de TCR. AGEN1884w o un anticuerpo de control del isotipo IgG₁ se incluyó en el contexto de la activación de TCR en formatos solubles o unidos a placa (0,003 a 50 µg/ml). Después de cuatro días en cultivo y de

una incubación final de 6 horas con Brefeldin A (BD GolgiPlug™), las células se tiñeron con anticuerpos conjugados con fluorocromo contra marcadores de linaje de superficie, incluyendo un anticuerpo anti-CD3 (APC Cy7, clon SP34), un anticuerpo anti-CD8 (PE Cy7, clon SKI) y un anticuerpo anti-CD4 (PercP Cy5.5, clon L200) seguido de permeabilización de las células con Cytofix-Cytoperm™ (Beckton Dickinson). Para la evaluación de la producción de citoquinas intracelulares, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-IFN γ (Alexa fluor 647, clon B27) y un anticuerpo anti-TNF α (PE, clon Mab11). Las células se adquirieron para el análisis de citometría de flujo utilizando un FACSCanto II y los análisis de datos se realizaron con Flowjo Versión 10.

Las concentraciones crecientes de AGEN1884w soluble (Figura 4D) o unida a placa (Figura 4E) no tuvieron impacto en el porcentaje de células T CD8 $^{+}$ IFN γ^{+} en comparación con el anticuerpo de control del isotipo IgG $_1$. A concentraciones tan altas como 50 μ g/ml, AGEN1884w no actuó como un anticuerpo agonista de CTLA-4.

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

A continuación, se examinó el anticuerpo AGEN1884w anti-CTLA-4 para determinar su sinergia con un anticuerpo antagonista anti-LAG-3 o anticuerpos antagonistas anti-PD-1 utilizando PBMC estimuladas sub-óptimamente con Enterotoxina A de Staphylococcus (SEA). Brevemente, las PBMC humanas crioconservadas (Research Blood Components) se sembraron en placas a razón de 10⁵ células/pocillo en RPMI1640 complementado con Normocin™ (Invivogen n° ant-nr) y FBS al 10% inactivado por calor (Gibco, Invitrogen Corporation) en un placas de superficie delta NUNCCLON de 96 pocillos (NUNC™). Las células se cultivaron con 100 ng/ml de SEA (Toxin Technologies) en presencia de 10 μ g/ml de AGEN1884w soluble o un control del isotipo IgG $_1$ junto con 5 μ g/ml de un anticuerpo IgG $_1$ AGEN1746 anti-LAG-3, Nivolumab (lote AAB5719, Myoderm), Pembrolizumab (lote 7002688300, Myoderm), un control del isotipo IgG $_1$ o un control del isotipo IgG $_4$ durante 5 días a 37°C, 5% de CO $_2$ y 97% de humedad. Los anticuerpos testados y sus concentraciones respectivas se muestran en la Figura 4F. El anticuerpo AGEN1746 anti-LAG-3 utilizado en este ensayo se generó en base a las regiones variables del anticuerpo 25F7 proporcionadas en la Publicación de Solicitud de EE.UU. N° US 2011/0150892. AGEN1746 comprende una cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 91 y una cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 92 (Tabla 8). Los sobrenadantes clarificados se recogieron y almacenaron a -80°C hasta el análisis. La citoquina IL-2 se detectó utilizando AlphaLISA (Perkin Elmer). Se calcularon la media y la desviación estándar de la concentración de IL-2.

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

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia de Aminoácidos
91	Cadena pesada de AGEN1746	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIR QPPGKGLEWIGEINHNGNTNSNPSLKSRTLSLDTSKNQF SLKLRSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNWFDWPWGQGLTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
92	Cadena ligera de AGEN1746	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDF AVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRSVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

Como se muestra en la Figura 4F, la combinación del anticuerpo AGEN1884w anti-CTLA-4 con el anticuerpo AGEN1746 anti-LAG-3, el anticuerpo anti-PD-1 Nivolumab o el anticuerpo anti-PD-1 Pembrolizumab potenció la producción de IL-2 a partir de PBMC estimuladas de manera subóptima con el superantígeno SEA frente al tratamiento con un solo agente.

5 6.2 Ejemplo 2: Comparación de anticuerpos anti-CTLA-4 con la región constante de IgG₁ o IgG₂

En este ejemplo, AGEN1884w, que es un anticuerpo IgG₁ humano, se convirtió en un anticuerpo IgG₂ humano, AGEN2041w. El anticuerpo AGEN2041w comparte la misma región variable de cadena pesada y la misma cadena ligera que AGEN1884w, pero comprende una región constante de IgG₂ humana. El anticuerpo AGEN2041w comprende una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 94 y una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 13.

Además, también se testó un cierto número de AGEN1884w con regiones Fc mutadas para examinar el impacto de la interacción de FcγR sobre la actividad antagonista de anticuerpos anti-CTLA-4. AGEN1884w-N297A comprende una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 95 y una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 13. AGEN1884w-S267E/L328F comprende una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 96 y una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 13. AGEN1884w-S239D/A330L/I332E comprende una secuencia de cadena pesada de SEQ ID NO: 97 y una secuencia de cadena ligera de SEQ ID NO: 13. Todos los residuos están numerados de acuerdo con el sistema de numeración de la UE.

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

La afinidad del anticuerpo AGEN2041w anti CTLA-4, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y un anticuerpo IgG₂ anti-CTLA-4 de referencia se analizó mediante resonancia de plasmón de superficie tal como se describe en la Sección 6.1.1. Los antígenos CTLA-4 testados fueron CTLA-4-Fc recombinante humano (R&D Systems, n° 7268-CT), CTLA-4 humana recombinante (Sino Biological, n° 11159-H08H), CTLA-4-Fc recombinante de cynomolgus (Sino Biological, n° 90213-C02H) y CTLA-4 recombinante de cynomolgus (Sino Biological, n° 90213-C08H). Los valores de afinidad se enumeraron en la Figura 5A.

A continuación, se analizó la unión de AGEN2041w a células Jurkat que sobre-expresan CTLA-4 humana en un ensayo de citometría de flujo similar al ensayo descrito en la Sección 6.1.2. Brevemente, las células Jurkat que sobre-expresan CTLA-4 humana (Promega) se tiñeron primero con diluciones en serie de AGEN2041w, un anticuerpo IgG₂ anti-CTLA-4 de referencia, o un control del isotipo IgG₂ y luego con anticuerpo kappa anti-humano de ratón conjugado con APC (Invitrogen). Las muestras se adquirieron en un FACSCanto II (BD Biosciences) y las intensidades medias de fluorescencia (MFI) se analizaron utilizando el software FlowJo (FlowJo, LLC). AGEN2041w se unió a células Jurkat que sobre-expresan CTLA-4 humana (Figura 5B).

La actividad de bloqueo al ligando de AGEN2041w, un anticuerpo IgG₂ anti-CTLA-4 de referencia, y un control del isotipo IgG₂ se examinó utilizando tecnología de matriz de suspensión tal como se describe en la Sección 6.1.5. Como se muestra en la Figura 5C, AGEN2041w inhibió la unión de CD80 y CD86 a CTLA-4.

La selectividad de AGEN2041w y un anticuerpo IgG₂ anti-CTLA-4 de referencia se comparó con un anticuerpo de control del isotipo IgG₂ utilizando tecnología de matriz de suspensión tal como se describe en la Sección 6.1.3. Como se muestra en las Figuras 5D y 5E, AGEN2041w se une específicamente a CTLA-4 humana y de cynomolgus. No se observó una unión significativa a miembros de la familia relacionados (CD28 humano recombinante, ICOS, BTLA y PD-1; y PD-1 recombinante de cynomolgus).

6.2.2 Efecto de anticuerpos anti-CTLA-4 con la región constante de IgG₁ o IgG₂ en las células T humanas después de la estimulación con Enterotoxina A de Staphylococcus (SEA)

Las actividades funcionales de anticuerpos AGEN1884w y AGEN2041w anti-CTLA-4 se testaron en un ensayo de PBMC humanas primario para la inducción de IL-2. El ensayo se realizó como se describe en la Sección 6.1.6. Brevemente, se cultivaron PBMC humanas en presencia de concentraciones crecientes de anticuerpos de 0,016, 0,08, 0,4, 2,0, 10, 50 y 250 µg/ml y 100 ng/ml de SEA (Toxin Technologies) durante 5 días. Los anticuerpos testados fueron anticuerpos AGEN1884w y AGEN2041w anti-CTLA-4, un control del isotipo IgG₁ y un control del isotipo IgG₂. El título de IL-2 se determinó por electroquimioluminiscencia (MSD).

Como se muestra en la Figura 6A, tanto AGEN1884w como AGEN2041w estimularon la producción de IL-2 después de la estimulación con SEA.

6.2.3 Efecto de anticuerpo anti-4-CTLA con la región constante de IgG₂ en IL-2-luciferasa de la línea celular informadora

A continuación, se evaluó la actividad funcional del anticuerpo AGEN2041w utilizando un ensayo informador de IL-2-luciferasa similar al arriba descrito. En resumen, células T (Jurkat) genéticamente manipuladas para expresar CTLA-4 en superficie y un gen informador de luciferasa aguas abajo de un promotor de IL-2 se añadieron a los pocillos que

contenían concentraciones crecientes de AGEN2041w o un control del isotipo IgG₂. Posteriormente, células Raji, que expresan endógenamente CD80 y CD86 fueron genéticamente manipuladas para expresar "Activador de Células T", se añadieron al cultivo celular. El "Activador de Células T" es un receptor patentado de la superficie celular que se une a receptores de células T (TCR) de una manera independiente del antígeno, conduciendo a la activación de las células T. La estimulación del TCR en la línea celular Jurkat genéticamente manipulada desencadena la expresión de IL-2, conduciendo a la producción de luciferasa. La adición de AGEN2041w a este ensayo bloquea el acoplamiento de CTLA-4 (expresado en células Jurkat) con sus ligandos naturales CD80 y CD86 (expresado en células Raji), aumentando la producción de luciferasa. Las concentraciones de luciferasa se cuantificaron utilizando Bio-Glo™ y los datos resultantes se utilizaron para determinar los valores máximos de respuesta múltiplo (incremento múltiplo con AGEN2041w en comparación con la actividad basal de luciferasa sin anticuerpos).

Como se muestra en la Figura 6B, concentraciones crecientes de AGEN2041w dieron como resultado una activación potenciada de las células T de una manera dependiente de la dosis. Por el contrario, el control del isotipo IgG₂ no potenció la expresión de luciferasa incluso a la concentración más alta testada.

6.2.4 Caracterización de AGEN1884w producido por un clon estable

En este ejemplo, AGEN1884w producida por un clon estable 105 (AGEN1884w-105) se examinó en cuanto a la unión de CTLA-4 expresada en la superficie celular y para la actividad funcional en un ensayo de PBMC primario humano.

Se analizó la unión de AGEN1884w-105 a células Jurkat que sobre-expresan CTLA-4 humana en un ensayo de citometría de flujo similar al ensayo descrito en la Sección 6.1.2. Brevemente, células Jurkat que sobre-expresan CTLA-4 humana (Promega) se tiñeron primero con diluciones en serie de AGEN1884w-105, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia, o un control del isotipo IgG₁ y luego con anticuerpo kappa anti-humano de ratón conjugado con PE (Invitrogen). Las muestras se adquirieron en un FACSCanto II (BD Biosciences) y las intensidades medias de fluorescencia (MFI) se analizaron utilizando el software FlowJo (FlowJo, LLC). AGEN1884w-105 se unió a células Jurkat que sobre-expresan CTLA-4 humana (Figura 7A).

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

6.2.5 Unión de anticuerpos anti-CTLA-4 a receptores gamma Fc expresados en superficie

La unión de anticuerpos anti-CTLA-4 a FcγRIIA, FcγRIIB y FcγRIIIA humanos, expresados en la superficie de células CHO se midió por citometría de flujo. Brevemente, células CHO se transfectaron con ADNc que codifica FcγRIIA^{H131}, FcγRIIB o FcγRIIIA^{V158} humano, generando las siguientes líneas celulares CHO: rCHO-huFcγRIIA⁺, rCHO-huFcγRIIB⁺ y rCHO-huFcγRIIIA⁺. Se realizó la unión de una titulación de dosis de anticuerpos que oscilaba entre 0,0056-1000 µg/ml y los anticuerpos primarios se detectaron con un anticuerpo secundario anti-F(ab') humano conjugado con Ficoeritrina (PE) (Jackson Immune Research). Las muestras se testaron mediante citometría de flujo y se analizaron los valores de intensidad de fluorescencia media (MFI) de PE y se utilizaron para generar curvas de unión. Los anticuerpos testados fueron AGEN1884w, AGEN2041w, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y un anticuerpo de control del isotipo IgG₁. En este estudio se utilizó AGEN1884w producido en dos medios de crecimiento diferentes: el medio de crecimiento CD FortiCHO™ de Life Technologies Inc./Thermo (AGEN1884w-FortiCHO) y el medio de crecimiento PowerCHO™ 2 de Lonza (AGEN1884w-PowerCHO). El anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia contiene un alotipo IgG₁ diferente al de AGEN1884w. El anticuerpo de control del isotipo IgG₁ solo se testó a 1000 µg/ml.

Como se muestra en la Figura 8A, AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO y AGEN2041w exhibieron una unión potenciada a células que expresan FcγRIIA^{H131} a como lo hacía el anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia. De manera similar, la unión de AGEN1884w-PowerCHO y AGEN1884w-FortiCHO a células que expresan FcγRIIB era más fuerte que la del anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia (Figura 8B). Todos los anticuerpos IgG₁ AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO y el anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia, se unieron de manera similar a FcγRIIIA^{V158} expresados en la superficie celular (Figura 8C). AGEN2041w mostró una unión más débil a FcγRIIB (Figura 8B) y FcγRIIIA^{V158} (Figura 8C) que lo hicieron los anticuerpos IgG₁.

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

La unión de los anticuerpos anti CTLA-4, AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO, AGEN2041w y un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia a FcγRIIA y FcγRIIIA humanos se midió utilizando resonancia de plasmón de superficie (BIAcore® 3000).

Para la unión a FcγRIIA, se aplicó el método de inmovilización directa a un chip CM5 utilizando química de aminas estándar. La proteína FcγRIIA-His recombinante humana se diluyó en solución de acetato de sodio, pH 4,0, a una concentración de 10 µg/ml y se inmovilizó en las celdas de flujo 2 y 4 utilizando una inyección de 8 minutos a una caudal de 5 µl/min. Las celdas de flujo 1 y 3, utilizadas como celdas de flujo de referencia, se acoplaron de manera

simulada, es decir, los reactivos de acoplamiento de amina se hicieron pasar sobre las celdas de flujo como en las celdas de flujo 2 y 4 sin FcγRIIA. El comportamiento de las superficies inmovilizadas de FcγRIIA se testó utilizando 1 mg/ml de Trastuzumab en tampón de desarrollo HBS-EP Biacore sobre cada una de las celdas de flujo para una inyección de 0,5 minutos a un caudal de 100 µl/min.

5 Para la unión a FcγRIIIA, el método de captura se llevó a cabo a través de un anticuerpo anti-tetra His inmovilizado a un chip CM5. El anticuerpo anti-His de ratón se diluyó en solución de acetato de sodio, pH 5,0, a una concentración de 10 µg/ml y se inmovilizó en las cuatro celdas de flujo utilizando una inyección de 5 minutos a un caudal de 10 µl/min a través de la química de aminas estándar. La proteína FcγRIIIA-His recombinante humana se capturó a la superficie del chip inyectando una solución de FcγRIIIA-His a una concentración de 1 µg/ml durante 2 minutos a un caudal de 5 µl/min.

Todos los anticuerpos de ensayo se intercambiaron con tampón en tampón de desarrollo Biacore antes del análisis. Las concentraciones de proteína de las muestras intercambiadas con tampón y las soluciones madre intermedias se determinaron midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 1000.

15 Cada una de las muestra se analizó en una serie de concentraciones de 8 puntos comenzando a 1000 µg/ml para una dilución doble. Los datos se recopilaron y procesaron utilizando el software de control Biacore versión 4.1 y el software BIAevaluation versión 4.1. Las curvas de dosis-respuesta se ajustaron a un modelo logístico de cinco parámetros (5PL). Los factores de ponderación de curva predeterminados utilizados fueron:

$$\text{Varianza} = 0.02 \times \text{respuesta (RU)}^{1-8}$$

20 Los datos de unión se analizaron también utilizando StatLIA versión 3.2. El paralelismo se evaluó con el test de chi cuadrado ($P < 0,01$) en StatLIA.

La respuesta media (unidad de resonancia) de AGEN1884w-FortiCHO, AGEN1884w-PowerCHO, AGEN2041w y un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia para FcγRIIA humano y FcγRIIIA humano se mostraron en las Figuras 9A y 9B, respectivamente.

6.2.7 Efecto de los anticuerpos anti-CTLA-4 sobre la línea celular informadora del receptor Fc gamma IIIA

25 La capacidad de AGEN1884w para co-acoplar CTLA-4 y señal *via* la activación de receptores gamma Fc se evaluó utilizando una línea celular informadora que expresa el receptor gamma Fc IIIA (FcγRIIIA) (Promega) junto con células diana (el esquema de ensayo se muestra en la Figura 10A) En este ensayo, células Jurkat que expresan CTLA-4 humano se utilizaron como células diana. Como células efectoras se utilizaron células Jurkat manipuladas que expresan FcγRIIIA de manera estable, ya sea la variante V158 (alta afinidad) o la variante F158 (baja afinidad), y un elemento de respuesta NFAT que impulsa la expresión de luciferasa de luciérnaga. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se mezclaron 25 µl de células diana (25.000 células) que expresan CTLA-4 con 25 µl de anticuerpos diluidos en serie a partir de 4 µg/ml en placas de fondo plano blanco de 96 pocillos. Luego se añadieron al pocillo 150.000 células efectoras en 25 µl y las placas se incubaron a 37°C durante la noche. La unión del complejo anticuerpo/antígeno, en el que el antígeno se encuentra en la superficie de las células diana, a las señales de FcγRIIIA a la construcción promotor/informador de las células efectoras y da como resultado la transcripción del gen luciferasa. Al día siguiente, se sacaron las placas de la incubadora y se dejaron enfriar durante 30 minutos. Se añadieron 75 µl de reactivo Bio-Glo a temperatura ambiente (Promega) a cada uno de los pocillos, se midió la luminiscencia mediante el Lector de Placas Multimodo EnVision (Perkin Elmer) y se registraron las unidades de luz relativas (RLU). Los anticuerpos probados fueron AGEN1884w-105 o AGEN 1884w (AGEN1884w-105 para las Figuras 10B, 10C, 10F y 10G, y AGEN1884w para las Figuras 10D y 10E); AGEN1884w-N297A (Figuras 10F y 10G); AGEN2041w (Figuras 10D y 10E); un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia (Figuras 10B y 10C); y un anticuerpo de control del isotipo IgG₁ (Figuras 10B-10G).

45 Cuando se une a células que expresan CTLA-4, el anticuerpo IgG₁ AGEN1884w-105 activó tanto la variante de FcγRIIIA V158 (Figura 10B) como la variante de FcγRIIIA F158 (Figura 10C). Como era de esperar, el anticuerpo IgG₂ AGEN2041w no señalizó *via* FcγRIIIA (Figuras 10D y 10E). Para confirmar la especificidad de este ensayo informador, se testó una variante silenciosa del receptor Fc (FcR) de AGEN1884w (AGEN1884w-N297A) en el mismo ensayo y este mutante tampoco señalizó *via* FcγRIIIA (Figuras 10F y 10G).

6.2.8 Efecto de anticuerpos anti-CTLA-4 sobre la línea celular informadora del receptor Fc gamma IIA

50 A continuación, se evaluó la capacidad de AGEN2041w de co-acoplar CTLA-4 y la señal *via* FcγRIIA utilizando una línea celular informadora que expresa FcγRIIA (Promega), junto con células diana (células Jurkat que expresan CTLA-4). Células Jurkat que expresan FcγRIIA con el polimorfismo 131 H/H de alta afinidad y un elemento de respuesta NFAT que impulsa la expresión de luciferasa de luciérnaga se utilizaron como células efectoras. Brevemente, se mezclaron 25 µl de células diana (6×10^6 células/ml) con 25 µl de anticuerpos diluidos en serie a partir de 0,1 µg/ml en pocillos duplicados de placas de ensayo blancas de 96 pocillos. Los anticuerpos testados fueron AGEN2041w, un anticuerpo IgG₂ anti-CTLA-4 de referencia y un anticuerpo de control del isotipo IgG₂. Luego, se añadieron 25 µl de células efectoras (6×10^6 células/ml) a cada uno de los pocillos, dando como resultado una relación 1:1 de efector a diana. Las placas se incubaron durante 20 horas a 37°C y 5% de CO₂. Después de esta incubación, el Reactivo de

Ensayo de Luciferasa Bio-Glo (Promega) se descongeló a temperatura ambiente y se añadieron 75 µl a cada uno de los pocillos. En el espacio de 5-10 minutos se midió la luminiscencia utilizando el lector de placas multimarcador EnVision (PerkinElmer). La luminiscencia de fondo se restó de cada una de las lecturas de muestra y se registraron las unidades de luz relativa (RLU) ajustadas.

- 5 Como se muestra en la Figura 11, cuando se une a células que expresan CTLA-4, el anticuerpo IgG₂ AGEN2041w activó FcγRIIA^{H131}.

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

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

- 10 Primero, se comparó la unión de AGEN1884w-105 y AGEN1884w-N297A a CTLA-4 expresada en la superficie celular en un ensayo de citometría de flujo similar al ensayo descrito en la Sección 6.1.2. Brevemente, células Jurkat que sobre-expresan CTLA-4 humana (Promega) se tiñeron primero con diluciones en serie de AGEN1884w-105, AGEN1884w-N297A o un control del isotipo IgG₁ y luego con anticuerpo kappa anti-humano de ratón conjugado con PE (Invitrogen). Las muestras se adquirieron en un FACSCanto II (BD Biosciences) y las intensidades medias de fluorescencia (MFI) se analizaron utilizando el software FlowJo (FlowJo, LLC). AGEN1884w-105 y AGEN1884w-N297A mostraron una unión similar a las células Jurkat que sobre-expresan CTLA-4 humana (Figura 12A).

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

- 20 A pesar de una unión similar a la de CTLA-4 expresada en la superficie celular (Figura 12A), AGEN1884w-N297A demostró una potenciación reducida de la secreción de IL-2 en comparación con la de AGEN1884w-105 en el ensayo de PBMC humano primario (Figura 12B).

- 25 Como evidencia adicional del requisito para el acoplamiento de FcR para las actividades funcionales, se testó la capacidad de los anticuerpos anti-CTLA-4 de inducir la secreción de IL-2 en presencia o ausencia de bloqueadores de FcR.

- 30 Se añadieron PBMC criopreservadas (10⁵ células/pocillo) en RPMI1640 complementado con penicilina, estreptomicina y FBS al 10% (Hyclone) a placas de superficie delta NUNCTM de 96 pocillos (NUNCTM). Las células se cultivaron con 100 ng/ml de SEA (Toxin Technologies) y 10 µg/ml de anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 o control del isotipo IgG₁ humano, en presencia o ausencia de bloqueadores de FcR durante 5 días a 37°C, 5% de CO₂ y 97% de humedad. Los anticuerpos anti-CTLA-4 testados fueron un anticuerpo IgG₁ de referencia (Figura 13A) y AGEN1884w-105 (Figura 13B). Los bloqueadores de FcR fueron anticuerpos anti-CD16 (Biolegend nº 302013), anti-CD32 (R&D nº AF1330) y anti-CD64 (R&D nº AF1257) (10 µg/ml cada uno) (Figura 13A) o anticuerpo anti-CD32 (eBiosciences nº 16-0329-81) solo (Figura 13B). En los grupos de control en la Figura 13B, AGEN1884w-105 y el control del isotipo IgG₁ humano también se incubaron con un control del isotipo IgG₁ de ratón (Biolegend nº 400124) como se indica en la figura. El sobrenadante clarificado se recogió y se almacenó a -80°C hasta el análisis. Los títulos de IL-2 se generaron por electroquimioluminiscencia (MSD).

- 35 El bloqueo de FcR, utilizando anticuerpos contra CD16, CD32 y CD64 (Figura 13A) o utilizando un anticuerpo contra CD32 (Figura 13B), disminuyó la capacidad de los anticuerpos anti-CTLA-4 de inducir la secreción de IL-2 en este ensayo de PBMC humano primario.

- 40 A continuación, se testó la actividad funcional de un cierto número de anticuerpos anti-CTLA-4 con regiones Fc mutadas utilizando PBMCs. Brevemente, PBMC humanas criopreservadas (Research Blood Components) se sembraron en placa a razón de 10⁵ células/pocillo en RPMI1640 complementado con NormocinTM (Invivogen) y FBS inactivado por calor al 10% (Gibco, Invitrogen Corporation) en placas de superficie delta NUNCTM de 96 pocillos (NUNCTM). Las células se cultivaron durante 5 días a 37°C, 5% de CO₂ y 97% de humedad en presencia de 142 ng/ml de SEA (Toxin Technologies) y 10 µg/ml de AGEN1884w, AGEN1884w-N297A, AGEN1884w-S267E/L328F, AGEN1884w-S239D/A330L/I332E, AGEN2041w, un anticuerpo de control del isotipo IgG₁ o un anticuerpo de control del isotipo IgG₂. El sobrenadante clarificado se recogió y se almacenó a -80°C hasta el análisis. Las concentraciones de IL-2 se midieron por ELISA.

- 45 AGEN1884w con la mutación triple S239D/A330L/I332E en la región Fc, que potencia la unión a FcγRIIIA, estimuló más secreción de IL-2 que AGEN1884w con la región Fc de IgG₁ de tipo salvaje (Figura 14).

6.2.10 Potencial de células efectoras mediado por Fc

- 50 En este ejemplo se analizó el anticuerpo AGEN1884w en cuanto a su capacidad para mediar en la citotoxicidad de células NK. Brevemente, células Jurkat manipuladas para expresar constitutivamente CTLA-4 en la superficie celular (células diana) se cultivaron a razón de 1 x 10⁴ células/pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos.

Concentraciones crecientes de AGEN1884w, un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia, o un anticuerpo de control del isotipo (todos a 0 a 10 µg/ml), y 5×10^4 células NK92-FcγRIIIA (células efectoras) se añadieron a las células diana. Después de incubar durante 6 horas a 37°C y 5% de CO₂, la lisis de las células diana se evaluó mediante cuantificación fotométrica de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el sobrenadante utilizando un Kit de detección de citotoxicidad (LDH) (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos se adquirieron utilizando un software SoftMax® Pro Microplate Data Acquisition & Analysis. Todas las concentraciones de anticuerpos se testaron por triplicado.

Como se muestra en la Figura 15, el anticuerpo AGEN1884w medió de manera efectiva en la lisis de células diana que expresan CTLA-4 en presencia de células efectoras.

6.2.11 Mapeo de epítomos del anticuerpo anti-CTLA-4

La interacción del fragmento Fab de AGEN1884w (AGEN1884w-Fab) con el dominio extracelular de CTLA-4 humana se estudió mediante espectrometría de masas por intercambio de hidrógeno-deuterio (HDX). El dominio extracelular de CTLA-4 sola o en combinación con AGEN1884w-Fab, en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,4, se diluyó con un volumen décuplo de tampón de marcaje de óxido de deuterio y se incubó durante períodos de tiempo variables (0, 60, 300, 1800 y 7200 segundos) a temperatura ambiente. El intercambio de deuterio por hidrógeno se enfrió bruscamente mediante la adición de un volumen de hidrócloruro de guanidina 4 M, tampón TCEP (tris(2-carboxietil)fosfina) 0,85 M y el pH final fue de 2,5. Las muestras se sometieron luego a digestión en columna con pepsina/proteasa tipo XIII y análisis LC-MS. Los espectros de masas se registraron solo en modo MS. Para el cálculo de la incorporación de deuterio, los espectros de masas para un péptido dado se combinaron a través del pico del cromatograma de iones extraídos y se calculó el promedio ponderado m/z. El aumento de masa de la masa del péptido nativo (0 minutos) a la masa promedio ponderada corresponde al nivel de incorporación de deuterio. Las curvas de acumulación de deuterio durante el tiempo de intercambio para todos los péptidos se trazaron para un análisis posterior y se compararon con el software HDEaminer.

La mayoría de los péptidos CTLA-4 mostraron niveles de deuterio idénticos o similares con y sin el Fab anti-CTLA-4 presente. Sin embargo, se descubrió que varios segmentos peptídicos tenían una incorporación de deuterio significativamente disminuida tras la unión de Fab. Todos los residuos en este párrafo están numerados de acuerdo con SEQ ID NO: 77. Dos regiones, Q⁸⁰VT⁸² (SEQ ID NO: 78) e Y¹³⁵PPPYLIGINGTQI¹⁴⁹ (SEQ ID NO: 79), experimentaron una fuerte protección contra el deuterio cuando CTLA-4 humana estaba unida a Fab. La disminución más fuerte en la absorción de deuterio se observó en Y¹⁴⁰L¹⁴¹, que parecía ser una característica principal del epítipo de AGEN1884w en CTLA-4. La inspección de las secuencias de CTLA-4 humana y de mono cynomolgus, a las que AGEN1884w se une fuertemente, revela una identidad de secuencia casi completa en las dos regiones arriba descritas, excepto por una sustitución de metionina por leucina en la posición 141 (Figura 17A). Por el contrario, AGEN1884w no se une de manera significativa a CTLA-4 de ratón o rata (datos no mostrados) que difieren del CTLA-4 humana en Y¹⁴⁰LGI¹⁴³ (SEQ ID NO: 80) en tres de las cuatro posiciones (Figura 17A). Datos de selectividad adicionales demuestran que AGEN1884w se une con alta especificidad a CTLA-4 humana y de mono cynomolgus y no a otros miembros de la familia CD28 relacionados, incluidos CD28, ICOS, BTLA y PD-1 (datos no mostrados). La comparación de secuencias entre estas proteínas relacionadas demuestra que las proteínas no CTLA-4 difieren en la secuencia Y¹⁴⁰LGI¹⁴³ (SEQ ID NO: 80) (Figura 17B), lo que respalda adicionalmente la importancia de este epítipo para la unión de AGEN1884w.

6.2.12 Estudio de Respuesta a Anticuerpos Dependientes de T (TDAR) en monos cynomolgus

Se realizó un estudio TDAR de ocho semanas en monos cynomolgus para examinar la capacidad de AGEN1884w y AGEN2041w de potenciar las respuestas de anticuerpos dependientes de células T a una vacuna contra la hepatitis B (ENERIX-G®) (HBsAg). La vacuna HBsAg se administró en tres inyecciones subcutáneas a razón de 10 µg por inyección (30 µg en total) en la pata trasera el Día 1 (cebado) y el Día 29 (refuerzo). AGEN1884w (N = 6) o AGEN2041w (N = 6) se administraron dos veces mediante inyección intravenosa en bolo (10 mg/kg) el Día 1 y el Día 29, junto con los antígenos de la vacuna. Utilizando el mismo programa de dosificación, un grupo control de animales (N = 3) recibió la vacuna HBsAg en combinación con 3 mg/kg de un anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia y otro grupo control de animales (N = 6) recibió la HBsAg con el artículo de control: tris hidrócloruro 20 mM, NaCl 100 mM, manitol al 1%, DTPA 0,10 mM, polisorbato 80 al 0,01%, pH 7,0, pero sin anticuerpo anti-CTLA-4. Durante el estudio de ocho semanas, se realizaron análisis (IgG) anti-HBsAg en muestras de suero recolectadas en puntos de tiempo seleccionados a lo largo del estudio (Día -20, -7, Día +15, +29, +43, +59 y +69). Los títulos de suero se midieron mediante un ensayo ELISA colorimétrico.

Los animales que recibieron AGEN1884w, AGEN2041w, el anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia o el artículo de control tenían respuestas anamnésicas normales con los títulos de anticuerpos mensurables después de la segunda dosis de vacuna, que alcanzó su punto máximo y disminuyó a partir de entonces (Figuras 18A y 18B). Sin embargo, AGEN1884w, AGEN2041w, y el anticuerpo IgG₁ anti-CTLA-4 de referencia demostraron potenciar la respuesta de IgG anti-HBsAg sobre el artículo de control dado en ausencia de un anticuerpo anti-CTLA-4.

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

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

6.3.1 Análisis de unión y bloqueo de ligando de anticuerpos anti-CTLA-4

La afinidad de los 19 anticuerpos anti-CTLA-4 arriba descritos se analizó mediante resonancia de plasmón de superficie en un ensayo similar al descrito en la Sección 6.1.1. El antígeno CTLA-4 testado fue CTLA-4-Fc humano recombinante (R&D Systems, nº 7268-CT). Los anticuerpos anti-CTLA-4 (6 µg/ml en tampón de desarrollo se capturaron en la superficie del chip de un chip sensor CM5. Los 19 anticuerpos se unieron a CTLA-4 humana recombinante con afinidad nM (datos no mostrados).

La actividad de bloqueo de ligando de los 19 anticuerpos anti-CTLA-4 se examinó utilizando tecnología de matriz de suspensión en un ensayo similar al descrito en la Sección 6.1.5. El bloqueo de ligando se testó en presencia de diferentes concentraciones de anticuerpos anti-CTLA-4 (3.000 ng/ml a 12 ng/ml antes de añadir perlas). Como se muestra en las Figuras 20A-20E, todos los 19 anticuerpos anti-CTLA-4 bloquearon la unión de CTLA-4 a CD80 y CD86.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> AGENUS INC., LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH LTD, MEMORIAL SLOAN KETTERING
CANCER CENTER

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

<130> 581170:AGBW-004PC

<140>

<141>

<150> 62/168,391

<151> 2015-05-29

<150> 62/182,363

<151> 2015-06-19

<150> 62/190,653

<151> 2015-07-09

<150> 62/257,202

<151> 2015-11-18

<150> 62/280,263

<151> 2016-01-19

<150> 62/292,500

<151> 2016-02-08

<150> 62/294,558

<151> 2016-02-12

<150> 62/323,226

<151> 2016-04-15

<160> 97

<170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 1
 Ser Tyr Ser Met Asn
 1 5
 10 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 2
 Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 3
 <211> 9
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 3
 Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile
 25 1 5
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr Leu Gly
 1 5 10

<210> 5

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 5

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

10 <210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 6

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 7

20 <211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

25 <400> 7

ES 2 803 655 T3

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

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

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

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

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 8

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

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

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

10

ES 2 803 655 T3

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

<211> 98

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Ala Arg

10 <210> 10

<211> 96

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> obtenida de una colección sintética

<400> 10

ES 2 803 655 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 11

<211> 96

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 11

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

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

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

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

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

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

10 <210> 12

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> obtenida de una colección sintética

ES 2 803 655 T3

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

ES 2 803 655 T3

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 13

ES 2 803 655 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 14

<211> 444

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 14

ES 2 803 655 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys
 210 215 220

ES 2 803 655 T3

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285

Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300

Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320

Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
325 330 335

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350

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

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

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

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

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 15

ES 2 803 655 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 16

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser
1 5

<210> 17
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 17
 Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile
 1 5
 <210> 18
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 15 <400> 18
 Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 19
 Gln Ser Val Ser Arg Tyr
 1 5
 25 <210> 20
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 20
 Gly Ala Ser

1
 <210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 21
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5
 10 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> obtenida de una colección sintética
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (3)..(3)
 <220>
 20 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 25 <223> puede ser Asn o Ser
 <400> 22
 Ser Tyr Xaa Met Xaa
 1 5
 <210> 23
 <211> 9
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética

- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (8)..(8)
- <223> puede ser Asp o Asn
- 5 <400> 23
- Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Xaa Ile
1 5
- <210> 24
- <211> 11
- <212> PRT
- 10 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> obtenida de una colección sintética
- <220>
- <221> VARIANTE
- 15 <222> (7)..(7)
- <223> puede ser Ser o Gly
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (8)..(8)
- 20 <223> puede ser Arg, Ser o Thr
- <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (11)..(11)
- <223> puede ser Gly o Ala
- 25 <400> 24
- Arg Ala Ser Gln Ser Val Xaa Xaa Tyr Leu Xaa
1 5 10
- <210> 25
- <211> 7
- <212> PRT
- 30 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> obtenida de una colección sintética
- <220>

<221> VARIANTE
 <222> (1)..(1)
 <223> puede ser Gly o Ala
 <220>
 5 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> puede ser Ala o Thr
 <220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (4)..(4)
 <223> puede ser Thr, Ser, Arg o Asn
 <400> 25
 Xaa Xaa Ser Xaa Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 26
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> puede ser Ser o Thr
 <220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> (8)..(8)
 <223> puede ser Trp o Phe
 <400> 26
 Gln Gln Tyr Gly Xaa Ser Pro Xaa Thr
 1 5
 30 <210> 27
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 27
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5
 5 <210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 28
 Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asn Ile
 1 5
 <210> 29
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 29
 20 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 <210> 30
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 30
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Tyr Leu Ala
 30 1 5 10
 <210> 31
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 31
 Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr
 5 1 5
 <210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 32
 Ala Thr Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 33
 15 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 20 <400> 33
 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 <210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 34
 Ala Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5
 30 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 35
 Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 5 1 5
 <210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 36
 Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 37
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 20 <400> 37
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 38
 <211> 118
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 38
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 30

ES 2 803 655 T3

[illegible]

<210> 39

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 39

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> obtenida de una colección sintética

<400> 41

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

ES 2 803 655 T3

[illegible]

<210> 42

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 42

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

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

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

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

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 43

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

10 <210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> obtenida de una colección sintética

<400> 44

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

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

ES 2 803 655 T3

20

25

30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 45

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

10 <210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 46

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5 <210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> obtenida de una colección sintética

<400> 47

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

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

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

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

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

ES 2 803 655 T3

	65					70						75					80
	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ser	Pro	Phe	
					85					90					95		
	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys						
				100					105								
	<210>	48															
	<211>	30															
	<212>	PRT															
5	<213>	Secuencia artificial															
	<220>																
	<223>	obtenida de una colección sintética															
	<400>	48															
	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	
	1				5					10					15		
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser			
				20					25					30			
10	<210>	49															
	<211>	14															
	<212>	PRT															
	<213>	Secuencia artificial															
	<220>																
15	<223>	obtenida de una colección sintética															
	<400>	49															
	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser			
	1				5					10							
	<210>	50															
	<211>	32															
20	<212>	PRT															
	<213>	Secuencia artificial															
	<220>																
	<223>	obtenida de una colección sintética															
	<400>	50															
	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr	Leu	Gln	
	1				5					10					15		
	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	
25				20					25					30			

<210> 51
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 51
 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 52
 10 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 15 <400> 52
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 <210> 53
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 53
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val Ser
 1 5 10
 25 <210> 54
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 54

ES 2 803 655 T3

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 55

<211> 30

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 55

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

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

10 <210> 56

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> obtenida de una colección sintética

<400> 56

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

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

<210> 57

<211> 23

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 57

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

25

<210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 58
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 <210> 59
 10 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 15 <400> 59
 Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 <210> 60
 <211> 10
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 60
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10
 25 <210> 61
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> obtenida de una colección sintética
 <400> 61

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 62

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

10 <210> 63

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> obtenida de una colección sintética

<400> 63

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 64

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 64

25 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 65

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 65

Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	

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

5 <210> 66

<211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> obtenida de una colección sintética

<400> 66

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

Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys
				20		

<210> 67

<211> 32

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 67

Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	

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

20 <210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> obtenida de una colección sintética

<400> 68

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

<210> 69

<211> 23

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 69

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

10 <210> 70

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> obtenida de una colección sintética

<400> 70

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 71

<211> 32

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 71

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 72

<211> 118

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> obtenida de una colección sintética
 5 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> puede ser Val o Leu
 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> (13)..(13)
 <223> puede ser Lys o Gln
 <220>
 <221> VARIANTE
 15 <222> (19)..(19)
 <223> puede ser Arg o Thr
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (33)..(33)
 20 <223> puede ser Ser o Ala
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (35)..(35)
 <223> puede ser Asn o Ser
 25 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (46)..(46)
 <223> puede ser Glu o Val
 <220>
 30 <221> VARIANTE
 <222> (78)..(78)
 <223> puede ser Ser o Thr
 <220>
 <221> VARIANTE

<222> (106)..(106)

<223> puede ser Asp o Asn

<400> 72

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

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

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

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

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 73

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> obtenida de una colección sintética

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

<223> puede ser Gly o Ala

15 <220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> puede ser Leu, Val o Phe

<220>

20 <221> VARIANTE

<222> (30)..(30)

<223> puede ser Ser o Gly
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (31)..(31)
 5 <223> puede ser Arg, Thr o Ser
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (34)..(34)
 <223> puede ser Gly o Ala
 10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (38)..(38)
 <223> puede ser Gln o His
 <220>
 15 <221> VARIANTE
 <222> (40)..(40)
 <223> puede ser Pro o Val
 <220>
 <221> VARIANTE
 20 <222> (45)..(45)
 <223> puede ser Arg o Ser
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (50)..(50)
 25 <223> puede ser Gly o Ala
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (51)..(51)
 <223> puede ser Ala o Thr
 30 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (53)..(53)
 <223> puede ser Thr, Arg, Ser o Asn
 <220>

<221> VARIANTE
 <222> (60)..(60)
 <223> puede ser Asp o Ala
 <220>
 5 <221> VARIANTE
 <222> (66)..(66)
 <223> puede ser Gly, Val o Ala
 <220>
 <221> VARIANTE
 10 <222> (73)..(73)
 <223> puede ser Leu o Phe
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (76)..(76)
 15 <223> puede ser Thr o Ser
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (77)..(77)
 <223> puede ser Arg o Ser
 20 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (93)..(93)
 <223> puede ser Ser o Thr
 <220>
 25 <221> VARIANTE
 <222> (96)..(96)
 <223> puede ser Trp o Phe
 <220>
 <221> VARIANTE
 30 <222> (100)..(100)
 <223> puede ser Gln o Pro
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (105)..(105)

<223> puede ser Glu o Asp

<400> 73

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Val Xaa Ile Lys

5 100 105

<210> 74

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 74

ES 2 803 655 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr		
			20					25					30				
Ser	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr		
65					70					75					80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Val	Gly	Leu	Met	Gly	Pro	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
			100					105					110				
Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro		
		115					120					125					
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly		
	130					135					140						
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn		
145					150					155					160		
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln		
				165					170					175			
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser		
			180					185					190				
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser		
		195					200					205					

ES 2 803 655 T3

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 75

<211> 448

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

ES 2 803 655 T3

<400> 75

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

ES 2 803 655 T3

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 76

<211> 448

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 76

ES 2 803 655 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp
 225 230 235 240

ES 2 803 655 T3

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

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

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

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

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

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

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

<210> 77

<211> 223

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 77

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15

ES 2 803 655 T3

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 20 25 30
 Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 35 40 45
 Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
 50 55 60
 Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
 65 70 75 80
 Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
 85 90 95
 Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
 100 105 110
 Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
 115 120 125
 Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
 130 135 140
 Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
 145 150 155 160
 Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
 165 170 175
 Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
 180 185 190
 Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
 195 200 205
 Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
 210 215 220

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 78

Gln Val Thr
1

<210> 79

<211> 15

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79
Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
1 5 10 15
<210> 80
<211> 4
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 80
Tyr Leu Gly Ile
1
<210> 81
10 <211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 81
Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr
1 5
15 <210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 82
Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile
20 1 5
<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25 <400> 83
Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
1 5 10
<210> 84
<211> 223
<212> PRT
30 <213> Macaca mulatta
<400> 84

ES 2 803 655 T3

```

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Arg Leu Asn Leu Ala
1          5          10          15

Thr Arg Thr Arg Pro Tyr Thr Leu Leu Phe Ser Leu Leu Phe Ile Pro
          20          25          30

Val Phe Ser Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
          35          40          45

Asn Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
          50          55          60

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65          70          75          80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
          85          90          95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
          100          105          110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
          115          120          125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Met Gly Ile Gly
130          135          140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145          150          155          160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
          165          170          175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
          180          185          190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
          195          200          205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
210          215          220

```

<210> 85

<211> 223

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 85

ES 2 803 655 T3

Met Ala Cys Leu Gly Leu Arg Arg Tyr Lys Ala Gln Leu Gln Leu Pro
1 5 10 15

Ser Arg Thr Trp Pro Phe Val Ala Leu Leu Thr Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30

Val Phe Ser Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val Val Leu Ala
35 40 45

Ser Ser His Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ser Pro Ser His
50 55 60

Asn Thr Asp Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr Asn Asp Gln
65 70 75 80

Met Thr Glu Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Glu Lys Asn Thr Val Gly
85 90 95

Phe Leu Asp Tyr Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu Ser Arg Val
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Leu
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly
130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Val Ala Val Ser Leu Gly Leu Phe Phe
165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Val Ser Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
210 215 220

<210> 86

<211> 223

<212> PRT

5 <213> Rattus norvegicus

<400> 86

ES 2 803 655 T3

Met Ala Cys Leu Gly Leu Gln Arg Tyr Lys Thr His Leu Gln Leu Pro
1 5 10 15

Ser Arg Thr Trp Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30

Ile Phe Ser Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val Val Leu Ala
35 40 45

Ser Ser His Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ala Ser Ser His
50 55 60

Asn Thr Asp Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr Asn Asp Gln
65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Val Lys Asn Thr Leu Gly
85 90 95

Phe Leu Asp Asp Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu Ser Arg Val
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Phe
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly
130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Val Thr Ala Val Ser Leu Asn Arg Thr Leu Lys Lys
180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
210 215 220

<210> 87

<211> 220

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 87

ES 2 803 655 T3

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val
1 5 10 15

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr
20 25 30

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
35 40 45

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
65 70 75 80

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

Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys
100 105 110

Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
115 120 125

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
130 135 140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
145 150 155 160

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
165 170 175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
180 185 190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
195 200 205

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
210 215 220

<210> 88

<211> 199

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 88

ES 2 803 655 T3

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
1 5 10 15

Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
20 25 30

Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val
35 40 45

Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp
50 55 60

Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu
65 70 75 80

Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
85 90 95

Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser
100 105 110

Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
115 120 125

His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
130 135 140

Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
145 150 155 160

Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro
165 170 175

Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
180 185 190

Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
195

<210> 89

<211> 289

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 89

Met Lys Thr Leu Pro Ala Met Leu Gly Thr Gly Lys Leu Phe Trp Val
1 5 10 15

ES 2 803 655 T3

Phe Phe Leu Ile Pro Tyr Leu Asp Ile Trp Asn Ile His Gly Lys Glu
 20 25 30
 Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile
 35 40 45
 Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr Cys Ala
 50 55 60
 Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr Cys Val
 65 70 75 80
 Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn Ile Ser
 85 90 95
 Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn Gly Ser
 100 105 110
 Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser
 115 120 125
 Thr Thr Leu Tyr Val Thr Asp Val Lys Ser Ala Ser Glu Arg Pro Ser
 130 135 140
 Lys Asp Glu Met Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Arg Leu Leu Pro
 145 150 155 160
 Leu Gly Gly Leu Pro Leu Leu Ile Thr Thr Cys Phe Cys Leu Phe Cys
 165 170 175
 Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala
 180 185 190
 Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln Thr
 195 200 205
 Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr Gly
 210 215 220
 Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly Ser
 225 230 235 240
 Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile Val
 245 250 255
 Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu Ala
 260 265 270
 Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val Arg
 275 280 285

Ser

<210> 90

5 <211> 288

ES 2 803 655 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

```

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1          5          10          15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
          20          25          30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
          35          40          45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
          50          55          60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65          70          75          80

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

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
          100          105          110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
          115          120          125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
          130          135          140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145          150          155          160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
          165          170          175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
          180          185          190

```

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 91

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 91

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln
100 105 110

ES 2 803 655 T3

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	115	120	125
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	130	135	140
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145	150	155
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	165	170	175
Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	180	185	190
Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	195	200	205
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	210	215	220
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	225	230	235
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	260	265	270
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	275	280	285
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	290	295	300
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	305	310	315
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	325	330	335
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	340	345	350
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	355	360	365

ES 2 803 655 T3

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

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

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

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

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

Gly

<210> 92

<211> 214

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 92

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

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

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Ser Val Ala Ala
100 105 110

ES 2 803 655 T3

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 93

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 93

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 803 655 T3

100	105	110
Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
115	120	125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
145	150	155
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350

ES 2 803 655 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 94

<211> 443

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 94

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 803 655 T3

115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly 130 135 140		
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn 145 150 155 160		
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln 165 170 175		
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser 180 185 190		
Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser 195 200 205		
Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys 210 215 220		
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe 225 230 235 240		
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val 245 250 255		
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe 260 265 270		
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro 275 280 285		
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr 290 295 300		
Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val 305 310 315 320		
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr 325 330 335		
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg 340 345 350		
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly 355 360 365		

ES 2 803 655 T3

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415

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

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

<210> 95

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 803 655 T3

130						135										140
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
145					150					155					160	
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
				165					170					175		
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
			180					185					190			
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
		195					200					205				
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
210						215					220					
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
225					230					235					240	
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
				245					250					255		
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	
			260					265					270			
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
		275					280					285				
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
	290					295					300					
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
305					310					315					320	
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
				325					330					335		
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
			340					345					350			
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
		355					360					365				
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
	370					375					380					

ES 2 803 655 T3

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

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

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

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

<210> 96

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> obtenida de una colección sintética

<400> 96

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 803 655 T3

145		150		155		160
Ser Gly Ala Leu Thr	Ser Gly Val His Thr	Phe Pro Ala Val	Leu Gln			
	165	170	175			
Ser Ser Gly Leu Tyr	Ser Leu Ser Ser	Val Val Thr Val	Pro Ser Ser			
	180	185	190			
Ser Leu Gly Thr Gln	Thr Tyr Ile Cys	Asn Val Asn His	Lys Pro Ser			
	195	200	205			
Asn Thr Lys Val Asp	Lys Arg Val Glu	Pro Lys Ser Cys	Asp Lys Thr			
	210	215	220			
His Thr Cys Pro Pro	Cys Pro Ala Pro	Glu Leu Leu Gly	Gly Pro Ser			
	225	230	235			240
Val Phe Leu Phe Pro	Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu Met	Ile Ser Arg			
	245	250	255			
Thr Pro Glu Val Thr	Cys Val Val Val	Asp Val Glu His	Glu Asp Pro			
	260	265	270			
Glu Val Lys Phe Asn	Trp Tyr Val Asp	Gly Val Glu Val	His Asn Ala			
	275	280	285			
Lys Thr Lys Pro Arg	Glu Glu Gln Tyr	Asn Ser Thr Tyr	Arg Val Val			
	290	295	300			
Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln Asp	Trp Leu Asn Gly	Lys Glu Tyr			
	305	310	315			320
Lys Cys Lys Val Ser	Asn Lys Ala Phe	Pro Ala Pro Ile	Glu Lys Thr			
	325	330	335			
Ile Ser Lys Ala Lys	Gly Gln Pro Arg	Glu Pro Gln Val	Tyr Thr Leu			
	340	345	350			
Pro Pro Ser Arg Glu	Glu Met Thr Lys	Asn Gln Val Ser	Leu Thr Cys			
	355	360	365			
Leu Val Lys Gly Phe	Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu	Trp Glu Ser			
	370	375	380			
Asn Gly Gln Pro Glu	Asn Asn Tyr Lys	Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp			
	385	390	395			400

ES 2 803 655 T3

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

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

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

<210> 97

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> btained from a synthetic library

<400> 97

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 803 655 T3

165										170					175				
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser				
			180					185					190						
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser				
		195					200					205							
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr				
	210					215					220								
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Asp				
225					230					235					240				
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg				
				245					250					255					
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro				
			260					265					270						
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala				
		275					280					285							
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val				
	290					295					300								
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr				
305					310					315					320				
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Leu	Pro	Glu	Glu	Lys	Thr				
				325					330					335					
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu				
			340					345					350						
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys				
		355					360					365							
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser				
	370					375					380								
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp				
385					390					395					400				
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser				
				405					410					415					
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala				
			420					425					430						
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly					
		435					440					445							

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a proteína CTLA-4 humana, que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
2. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende una región constante de la cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en una región constante de IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂ humana.
3. El anticuerpo aislado de la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo comprende una región constante de la cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en una IgG_k humana y una región constante de IgG_λ.
4. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93 y/o comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.
5. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 y/o comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.
6. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 93, y en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.
7. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y en donde la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.
8. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el anticuerpo es biespecífico.
9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable.
10. Un polinucleótido aislado que codifica:
 - una región variable de la cadena pesada del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y una región variable de la cadena ligera del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, o
 - una cadena pesada del anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y una cadena ligera del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
11. Un vector que comprende el polinucleótido de la reivindicación 10.
12. Una célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido de la reivindicación 10 o el vector de la reivindicación 11.
13. Un método para producir un anticuerpo que se une específicamente a proteína CTLA-4 humana, comprendiendo el método cultivar la célula huésped de la reivindicación 12 de modo que el polinucleótido se exprese y se produzca el anticuerpo.
14. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o la composición farmacéutica de la reivindicación 9 para uso en un método para:
 - (a) el tratamiento del cáncer; y/o
 - (b) el tratamiento de una enfermedad infecciosa.

Figura 1A

Resonancia de plasmon de superficie (K_D)

	Ser humano		Cynomolgus		Ratón		Rata	
	CTLA-4		CTLA-4		CTLA-4		CTLA-4	
AGEN1884	dímero	monómero	dímero	monómero	dímero	monómero	dímero	monómero
	0,6 nM	0,8 nM	6,2 nM	1,6 nM	9,9 nM	sin unión	sin unión	sin unión
Anticuerpo Referencia (IgG1)	0,54 nM	1,2 nM	1,2 nM	0,75 nM	1,2 nM	26 nM	22 nM	

Células que expresan CTLA-4

Figura 1B

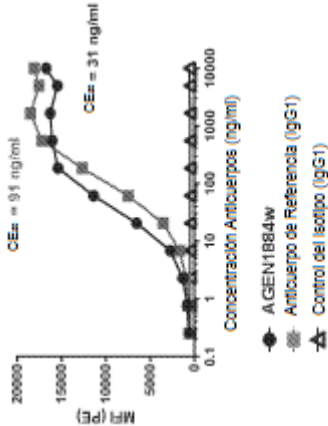


Figura 1C

Ensayo Selectividad CTLA-4

	Conc. en ng/ml	rhCTLA-4 Fc (R&D)	rcCTLA-4 Fc (Sino)	rhCD28 Fc (R&D)	rhICOS Fc (R&D)	rhBTLA Fc (Sino)	rhPD-1 Fc (R&D)	rcPD-1 Fc (4AB)
AGEN1884	1000	22729	18557	45	43	87	15	32
	100	20859	12676	48	47	115	25	41
	10	7820	4098	77	60	95	32	46
Anticuerpo Referencia (IgG1)	1000	20845	21590	52	46	87	24	40
	100	19131	19810	55	53	87	28	41
	10	6825	7245	65	57	92	35	41
Control del isotipo (IgG1)	1000	79	154	57	34	73	31	49
	100	75	186	67	67	123	39	45
	10	88	175	52	48	91	31	30

Figura 1D

Afinidad de Unión Relativa

	AGEN1884	Anticuerpo Referencia (IgG1)	Control del isotipo (IgG1)
rhCTLA-4	+++	+++	-
rcCTLA-4	+++	+++	-
rhCD28	-	-	-
rhICOS	-	-	-
rhBTLA	-	-	-
rhPD-1	-	-	-
rcPD-1	-	-	-

Figura 2A

Células T Humanas Primarias
(Superficie)

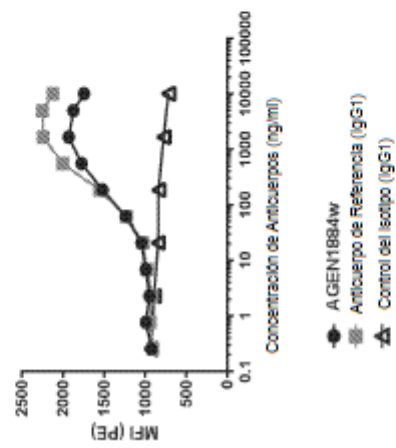


Figura 2B

Células T de Cynomolgus Primarias
(Intracelular)

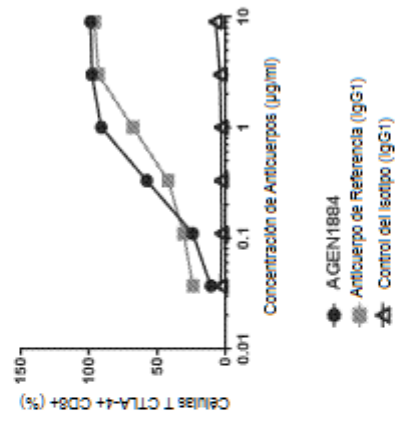


Figura 2C

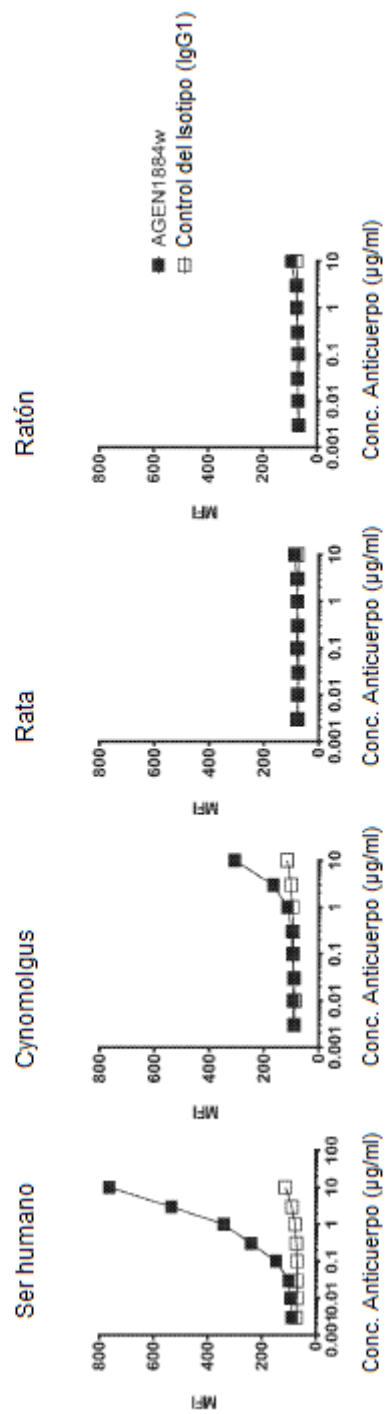


Figura 3A

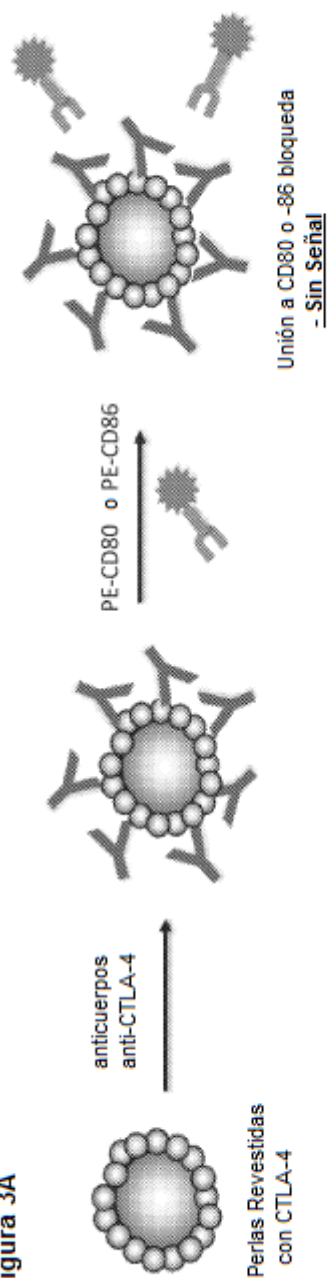


Figura 3B

Inhibición de unión CD80 a CTLA-4

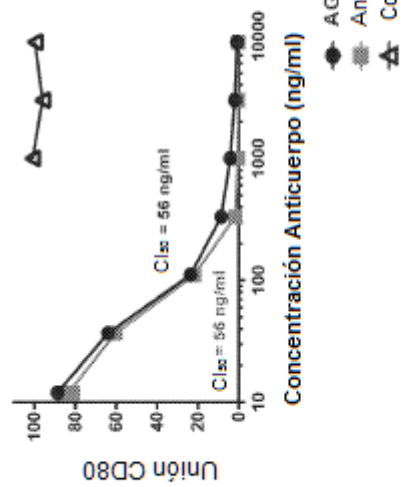


Figura 3C

Inhibición de unión CD80 a CTLA-4

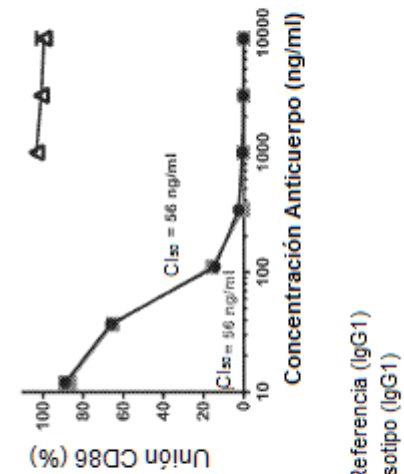


Figura 3D

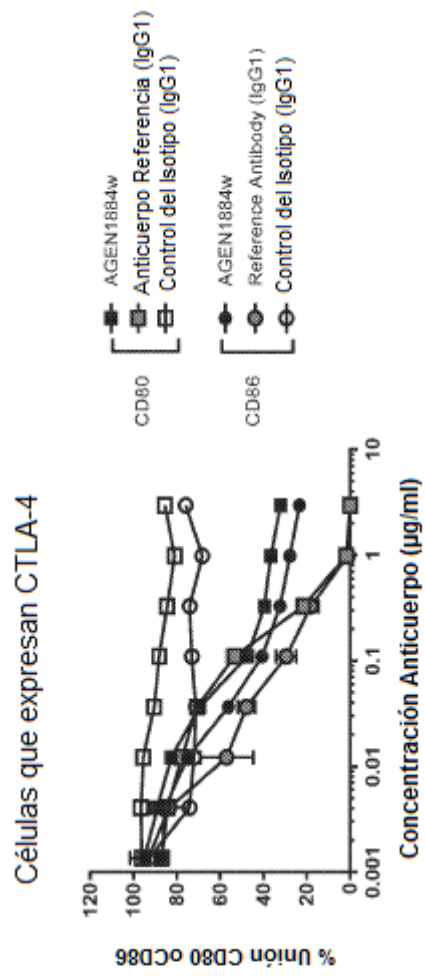


Figura 3E

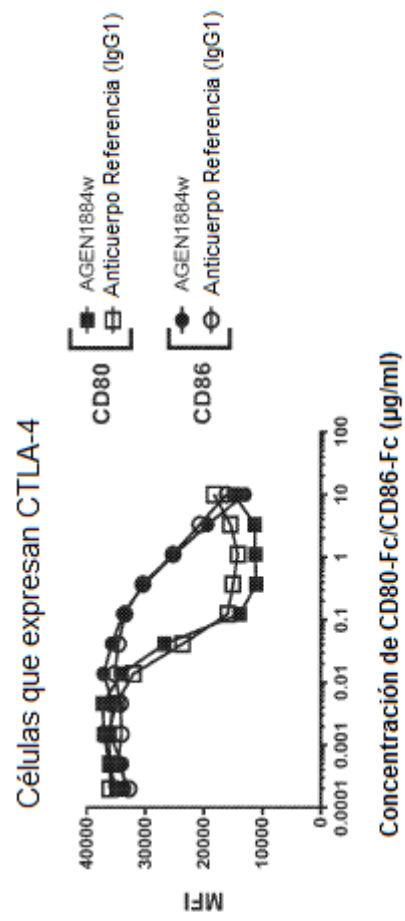
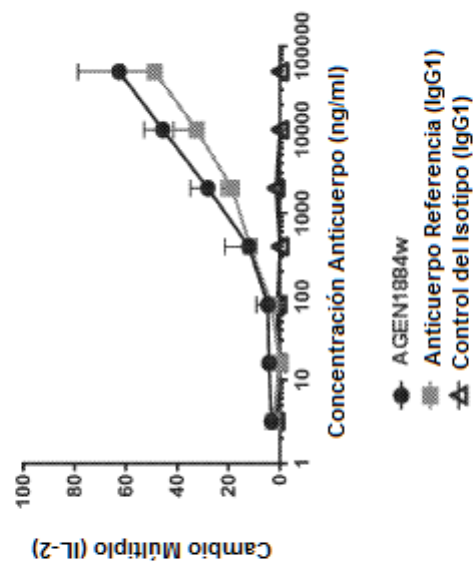


Figura 4A

Función células T potenciada



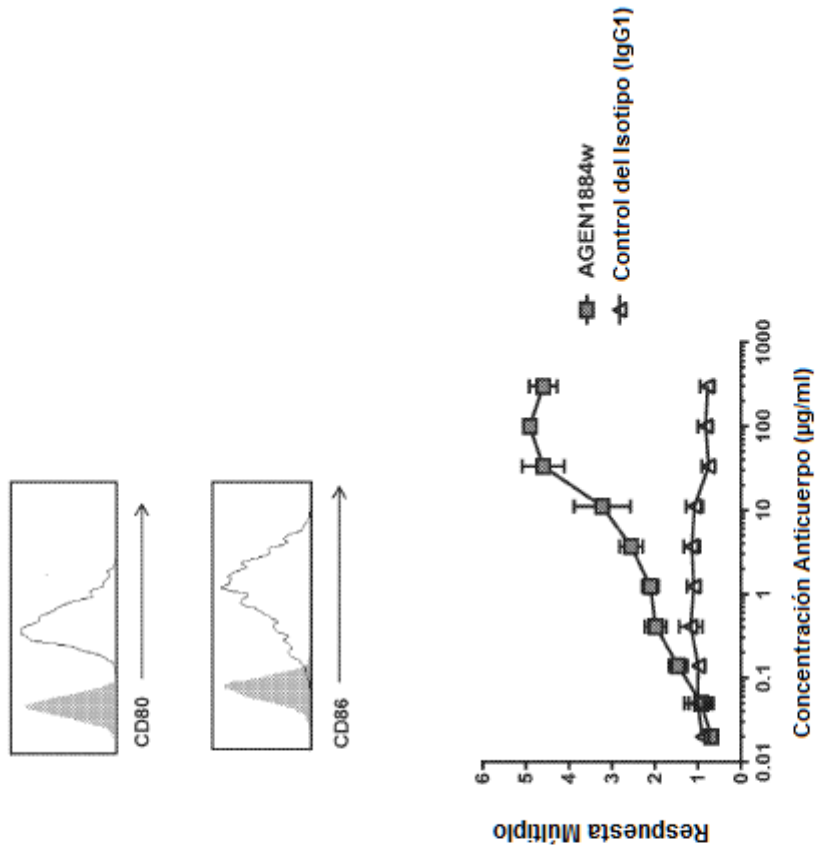


Figura 4B

Figura 4C

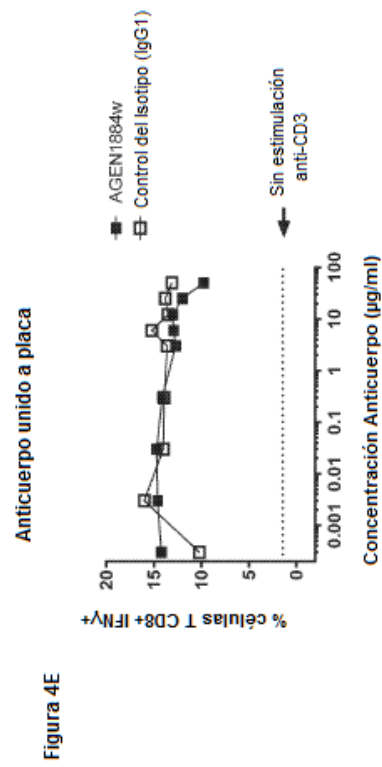
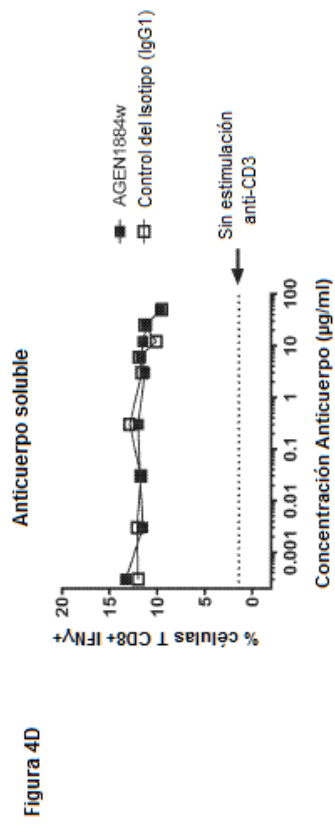


Figura 4F

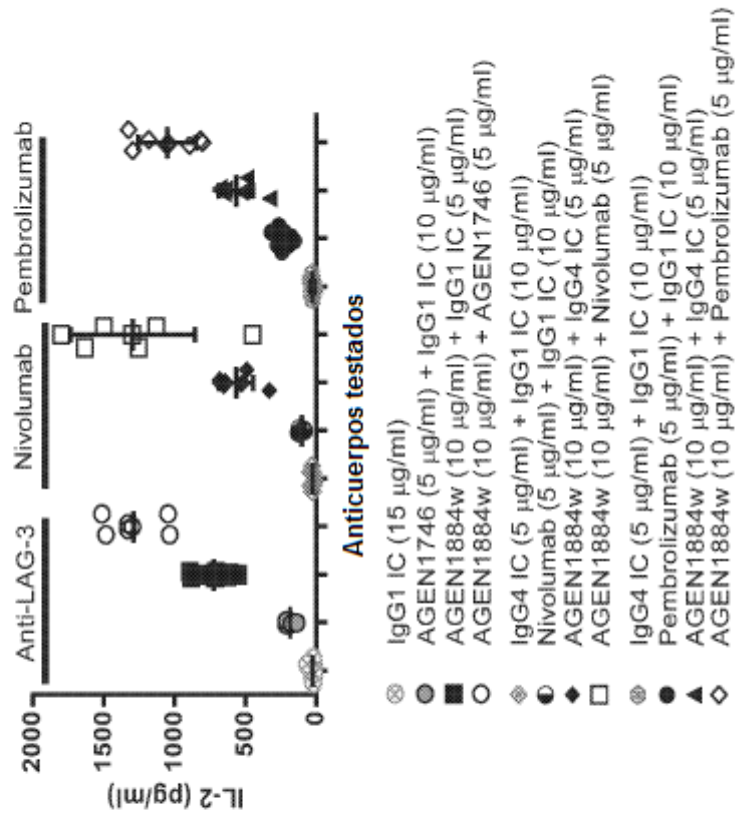


Figura 5A

Resonancia de Plasmon de Superficie (K_D)

	Ser humano		Cynomolgus	
	CTLA-4		CTLA-4	
	dímero	monòmero	dímero	monòmero
AGEN2041w	1,7 nM	2,0 nM	4,4 nM	2,1 nM
Anticuerpo Referencia (IgG1)	0,5 nM	1,2 nM	1,2 nM	0,8 nM
Anticuerpo Referencia (IgG2)	1,5 nM	1,6 nM	3,1 nM	1,5 nM

Figura 5B

Células que expresan CTLA-4

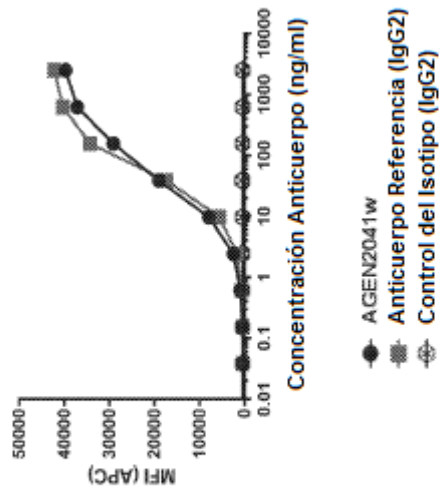


Figura 5C

Inhibición de unión de CD80 y CD86 a CTLA-4

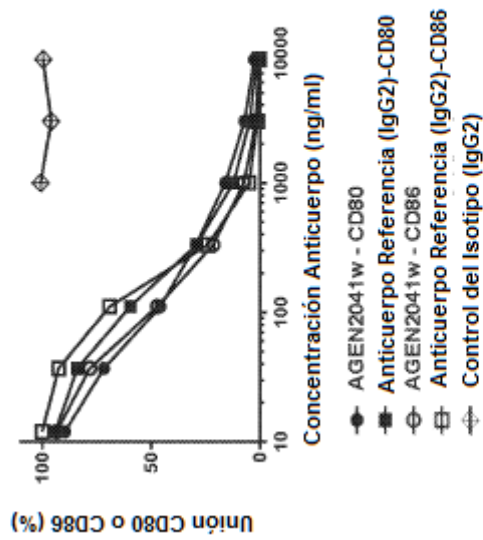


Figura 5D

Ensayo Selectividad CTLA-4

	Conc. en ng/ml	rhCTLA-4 Fc (R&D)	rhCTLA-4 Fc (Sino)	rhCD28 Fc (R&D)	rhICOS Fc (R&D)	rhBTLA Fc (Sino)	rhPD-1 Fc (R&D)	rhPD-1 Fc (4AB)
AGEN2041w	1000	16693	13685	58	48	95	30	31
	100	15890	9949	42	43	104	19	27
	10	7737	3684	73	55	89	32	29
Anticuerpo Referencia	1000	17288	16442	58	49	106	33	39
	100	13932	13721	62	47	102	43	50
	10	4846	5143	71	59	111	36	60
Control del Isotipo (IgG2)	1000	79	158	84	41	93	36	41
	100	83	184	52	57	88	94	96
	10	80	187	55	58	99	79	70

Afinidad de Unión Relativa

Figura 5E

	AGEN2041w	Anticuerpo Referencia (IgG2)	Control del isotipo (IgG2)
rhCTLA-4	+++	+++	-
rhCTLA-4	+++	+++	-
rhCD28	-	-	-
rhICOS	-	-	-
rhBTLA	-	-	-
rhPD-1	-	-	-
rhPD-1	-	-	-

Figura 6A

IgG1 frente a IgG2

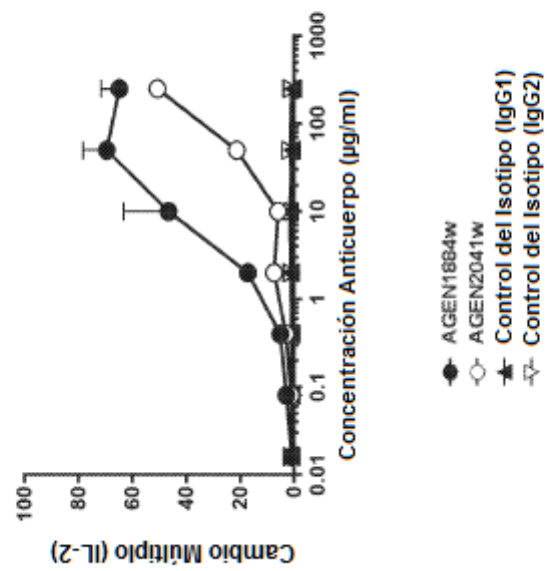


Figura 6B

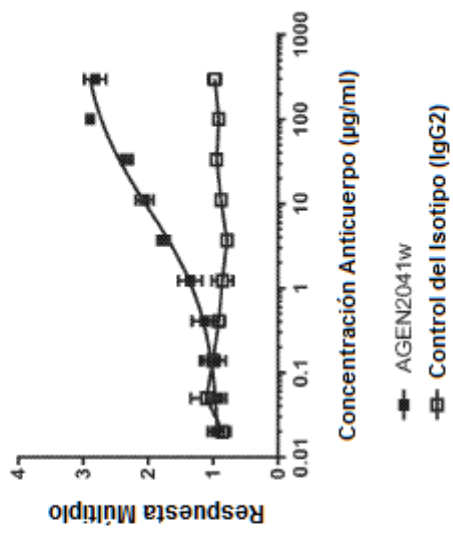


Figura 7A

Células que expresan CTLA-4

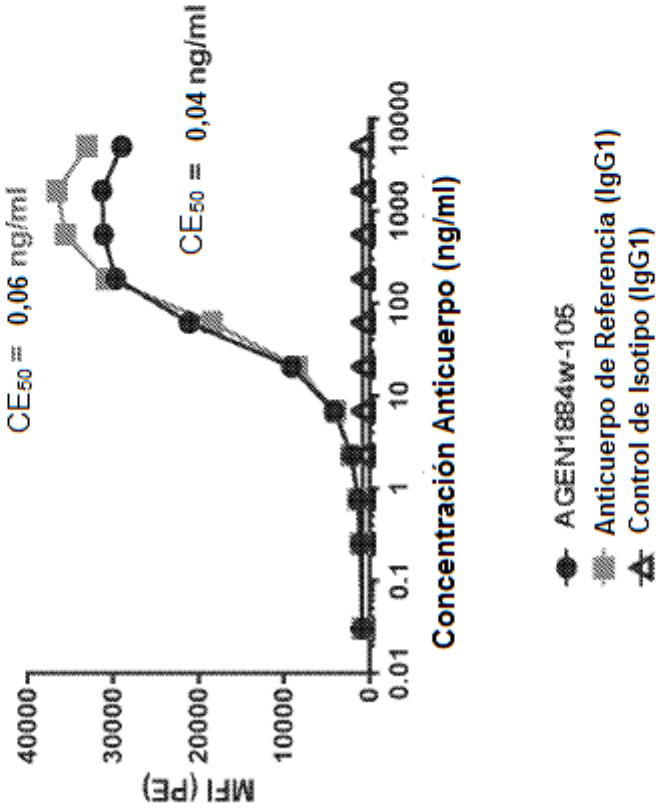


Figura 7B

Función potenciada de células T

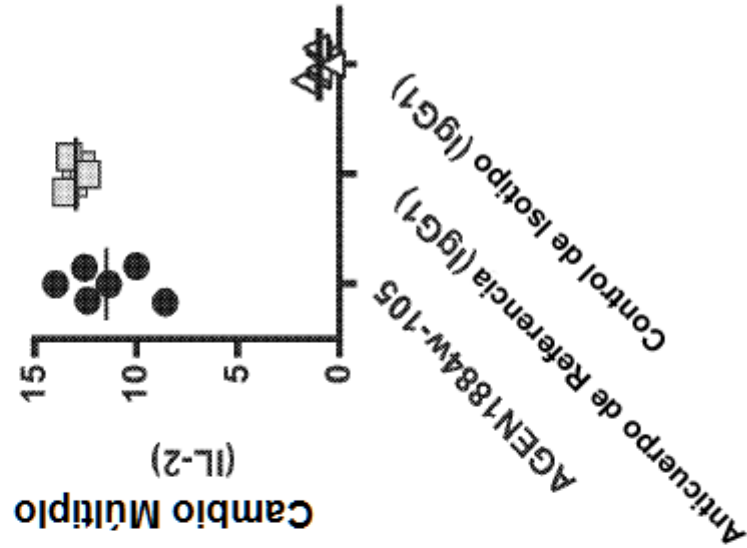


Figura 8A

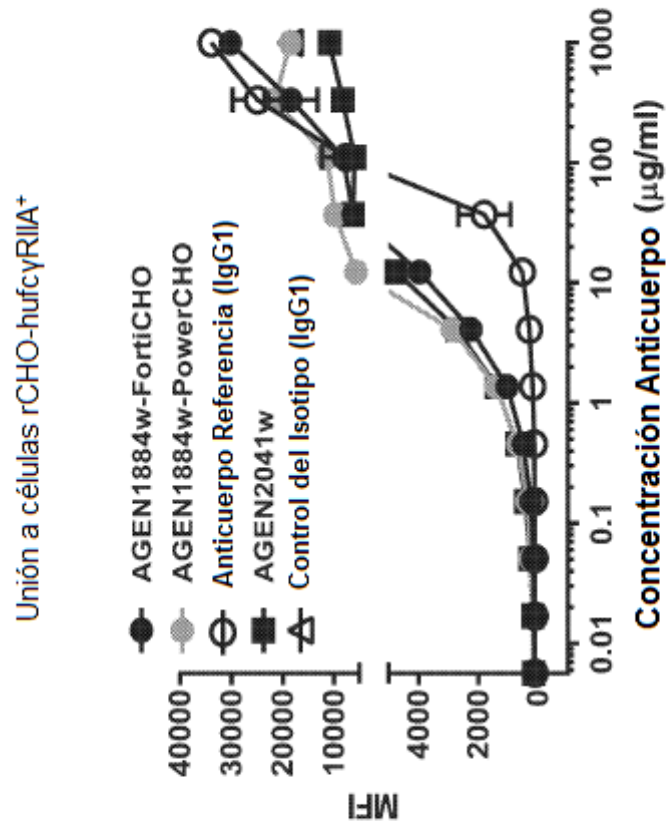


Figura 8B

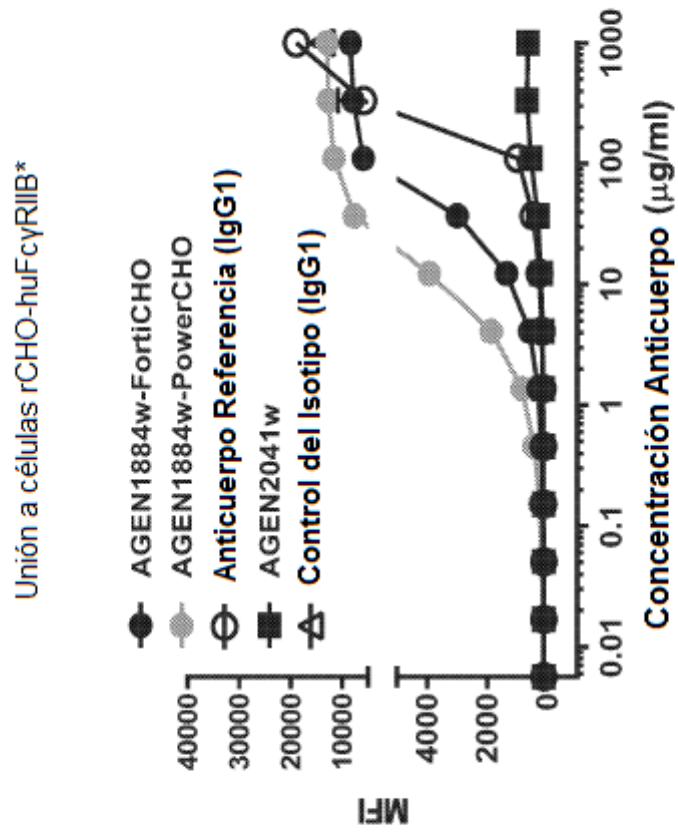


Figura 8C

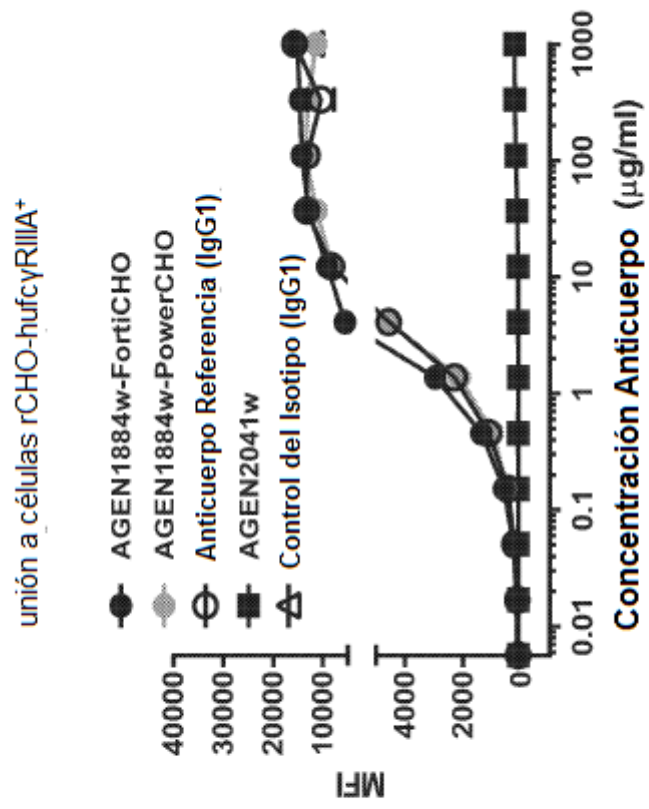


Figura 9A

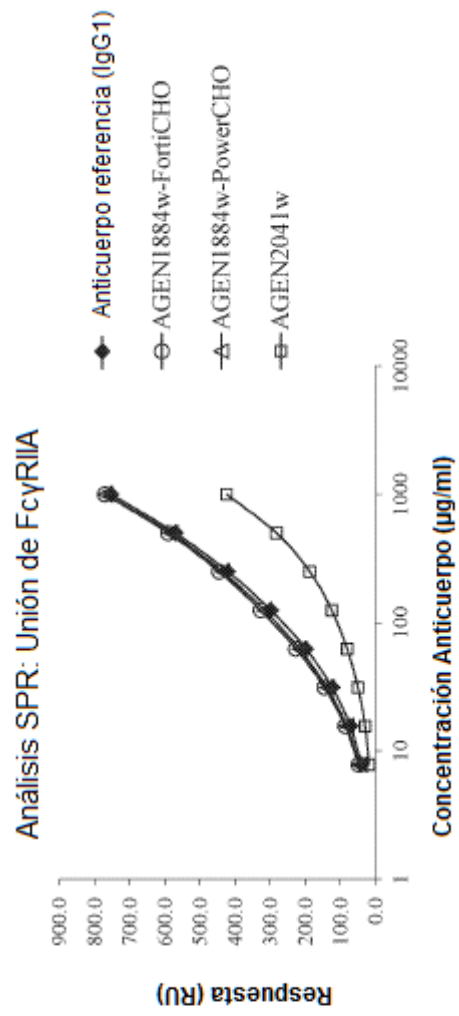


Figura 9B

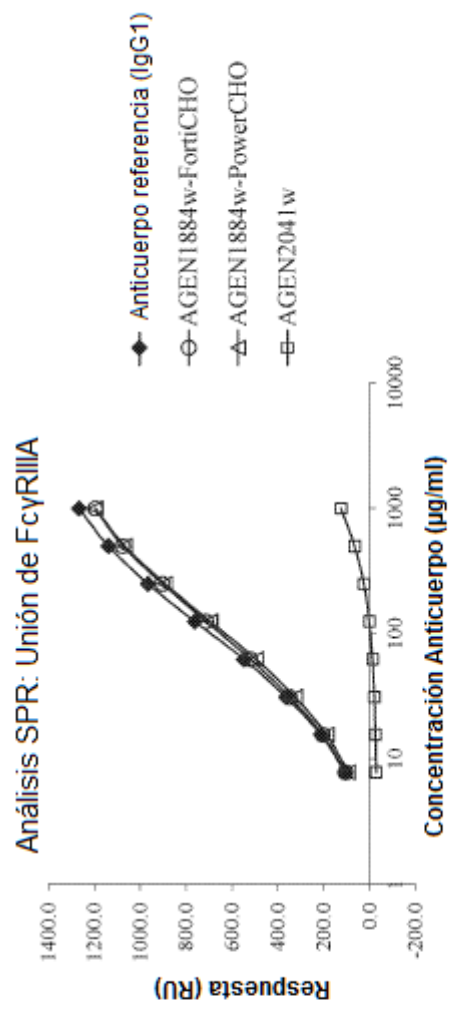


Figura 10A

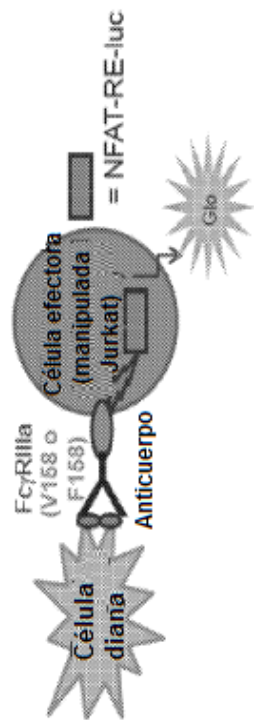


Figura 10B

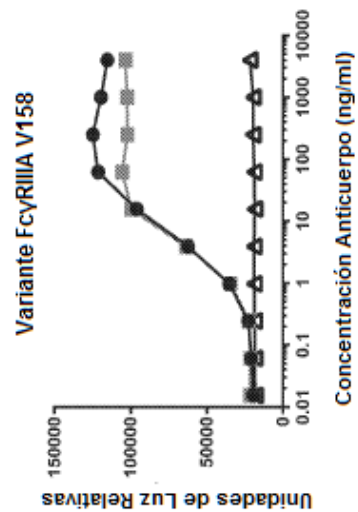
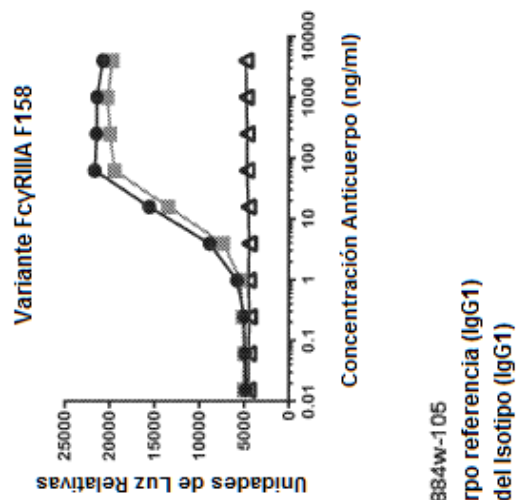


Figura 10C



- AGEN1884w-105
- Anticuerpo referencia (IgG1)
- △ Control del Isotipo (IgG1)

Figura 10 D

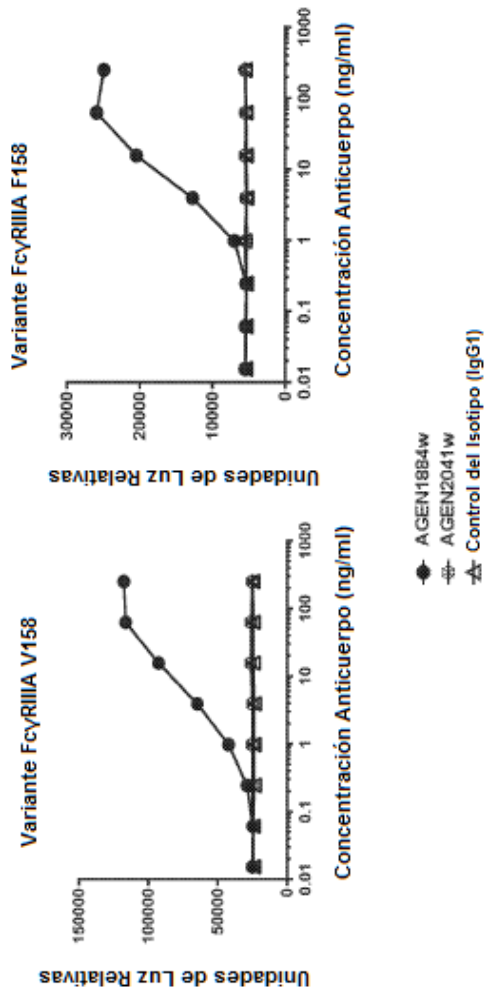


Figura 10E

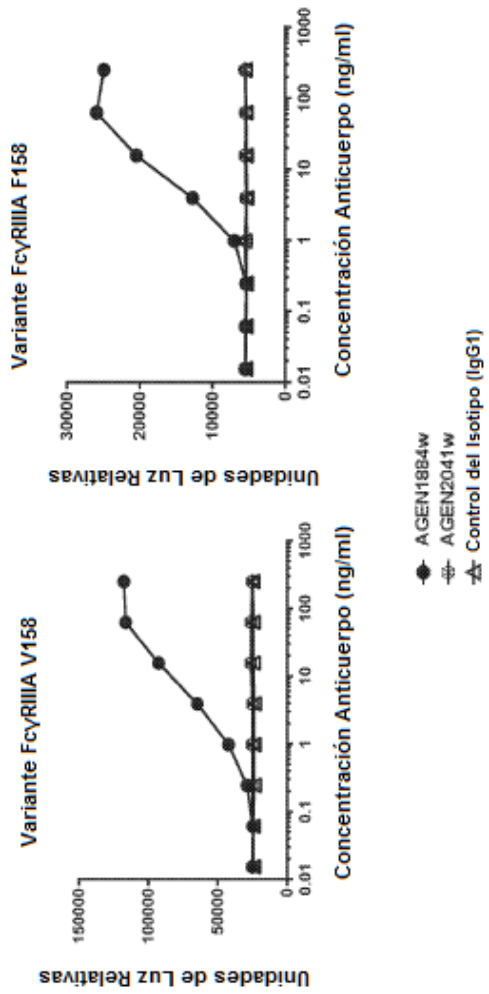


Figura 10F

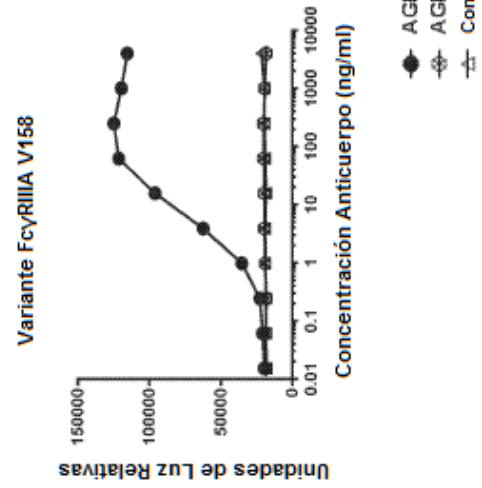


Figura 10G

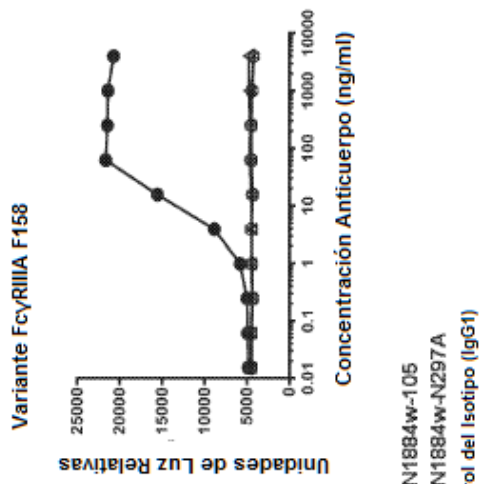


Figura 11

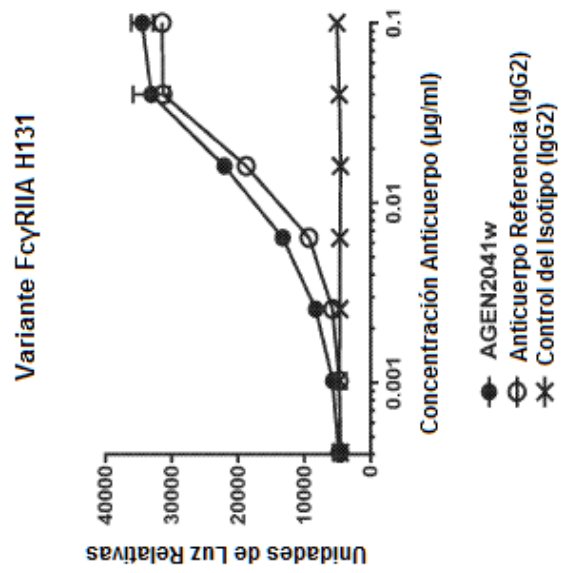


Figura 12A

Unión a células que expresan CTLA-4

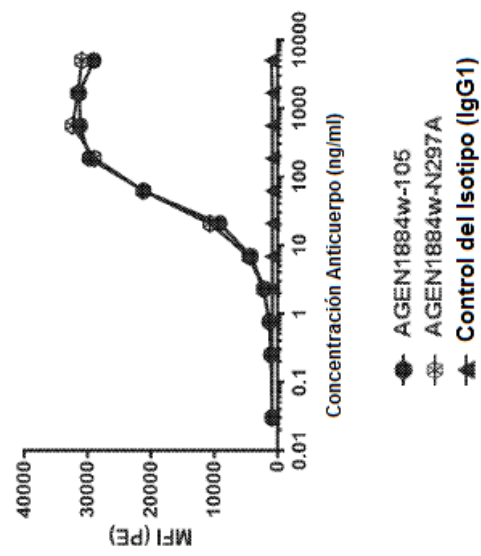


Figura 12B

Actividad funcional comprometida

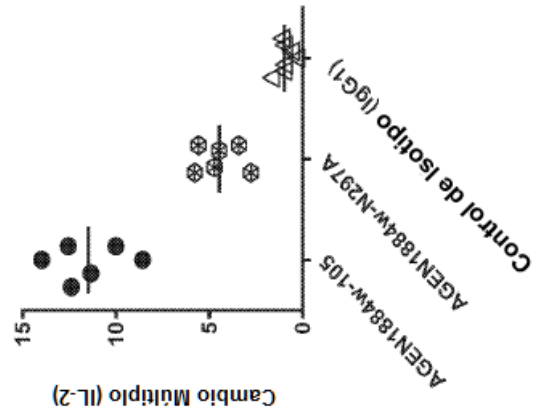


Figura 13A

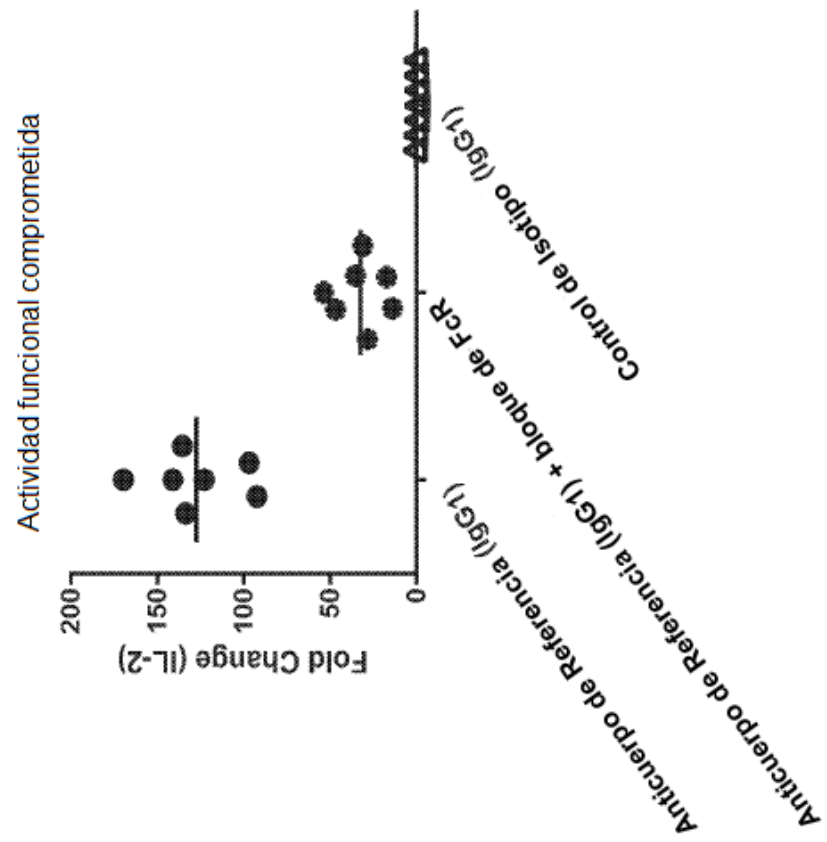
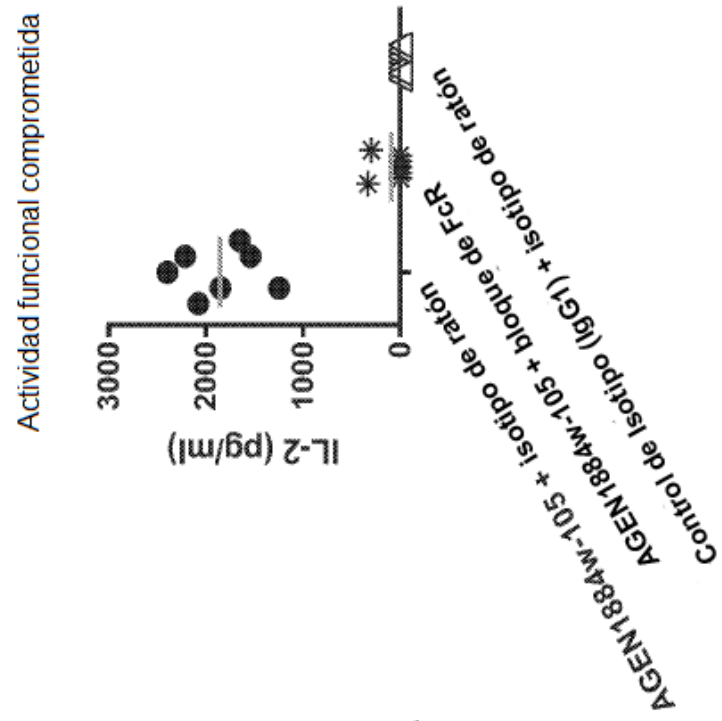


Figura 13B



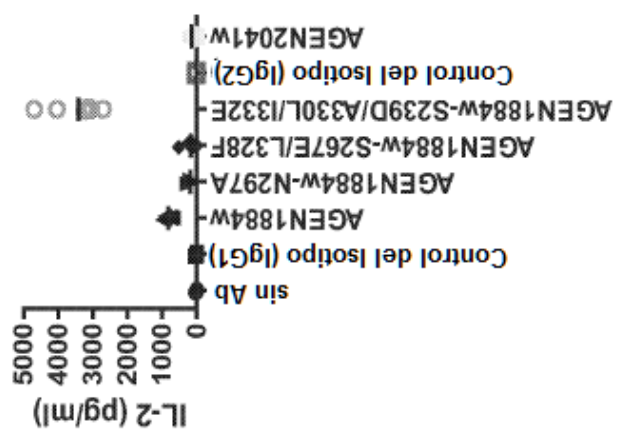


Figura 14

Figura 15

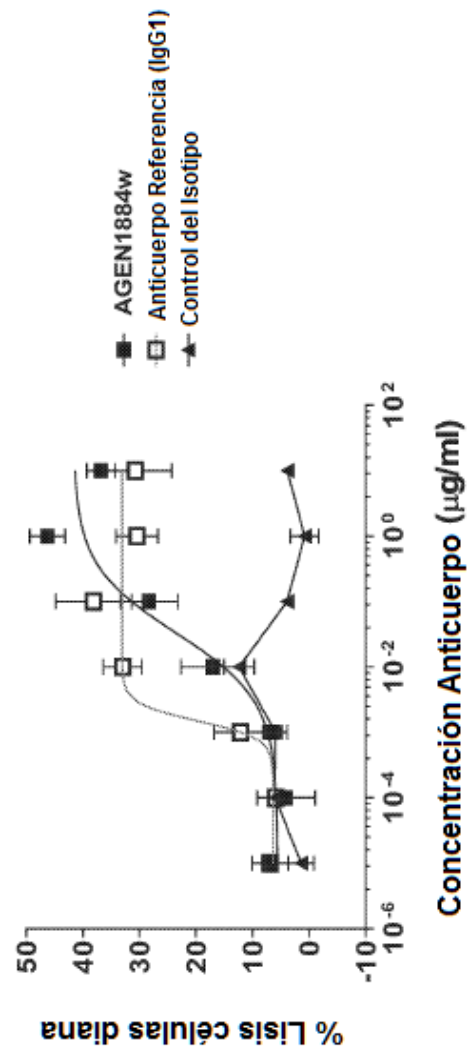
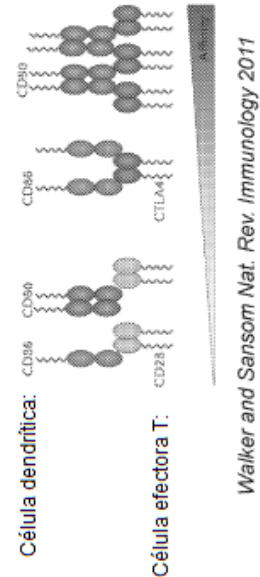


Figura 16



CTLA-4-Ig	K _D (nM)
CD80-Fc-His*	0,3 nM
CD86-Fc-His*	3,6 nM
Anticuerpo Referencia (IgG1)	0,5 nM
AGEN1884	0,6 nM

* Modificado de: Xu et al., JI 2012

Figura 17A

P16410	CTLA4_HUMANO	1	MACIGFORHQAQNLATRTWECILLFLFIPVFCAMHVAQPAVVLAASSRGIASFVCEY	60
G7FL88	CTLA4_MACFA	1	R.....R.Y.....S.....S.....N.....	60
P09793	CTLA4_RATÓN	1	IR.Y.....Q.PS.....FVA.LT.....SE.IQ.T.S.....H.V...P....	60
Q62859	CTLA4_RATA	1	L.Y.TH.Q.PS....FGV.LS....I.SE.IQ.T.S.....H.V...P....	60
			*****::*:*:*: * * * *: *****::*:*:*: *****::*:*:*: *	
P16410	CTLA4_HUMANO	61	ASPGKATEVRVTVLROADSQVTEVCAATYMGNELTFLDSDICTGTSSGNQVNLTIQGLR	120
G7FL88	CTLA4_MACFA	61		120
P09793	CTLA4_RATÓN	61	SPSHNTD.....TND.M....T.FTEK.TVG...YFF.S..FNESR.....	120
Q62859	CTLA4_RATA	61	..SHNTD.....TND.....T.FTVK.T.G...PF.S..FNESR.....	120
			: : *****::*:*:*: * * * *: *****::*:*:*: *****	
P16410	CTLA4_HUMANO	121	AMDTGLYICKVELMYPEPYLIGINGTQIYVIDPEPCPSDFLLNILAAYSSGLFFYSFL	180
G7FL88	CTLA4_MACFA	121	M.....	180
P09793	CTLA4_RATÓN	121	.V.....L.....FV.M.....V...L.....	180
Q62859	CTLA4_RATA	121	.A.....F.....FV.M.....	180
			* *****::*:*:*: *****::*:*:*: *****	
P16410	CTLA4_HUMANO	181	LTAVSLSKMLKRSPLTGTGVVVMPPTEPECEKQFQPIPIN	223
G7FL88	CTLA4_MACFA	181		223
P09793	CTLA4_RATÓN	181	VS.....	223
Q62859	CTLA4_RATA	181	V....NRT.....	223
			::***.: *****::*:*:*: *****	

Figura 17B

```

SP|P16410|CTLA4_HUMANO  MACLGQRHKAQINLATRTPCTILLFLLFIP--VFC-----KAMHVAQPAVLA--- 48
TR|G7PL88|G7PL88_MACEFA  MACLGQRHKAQINLATRTPCTILLFLLFIP--VFS-----KAMHVAQPAVLA--- 48
SP|P10747|CD28_HUMANO    -----MRLLIALN--LFPS-IQVTGNKILVKQSP-MLV--- 30
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMANO    -----MKSGLWY-----FF--LFCLRIKVLITGINGSANYEMFI--- 32
SP|Q7Z6A9|BTLA_HUMANO    -----MKTLIPAMLTGCKLFWV---FFLIPYLDIWNHGHKESCDVQLYIK 41
SP|Q15116|PDCD1_HUMANO    -----MQIPQAPFVWVAVLQLGWRPGWFLDSPD-RPMNPPTFSPALLVV--- 44
                                     *
SP|P16410|CTLA4_HUMANO    -----SSRGIAFVCEYASPGKA---TEVRVTVIRQADSQVTEVCAATYMMGNE--LT 96
TR|G7PL88|G7PL88_MACEFA    -----NSRGIAFVCEYASPGKA---TEVRVTVIRQADSQVTEVCAATYMMGNE--LT 96
SP|P10747|CD28_HUMANO    -----AYDNAVNLSCKYSYNLFS-----REFRASHLHKLDSA-VEVCVYIGNYSQQLOVY 79
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMANO    -----FHNGGVQILCKYPD--IV---QQFKMQLLKGQ---ILCDLTKTKSGSNTVS 76
SP|Q7Z6A9|BTLA_HUMANO    RQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPVHTWCKLN--GT-----TCVKLEDRQ----- 86
SP|Q15116|PDCD1_HUMANO    -----TEGDNATFTCSFNTSESFVLNWTYRMSPSNQTDK-----LAAFPEDR----- 86
                                     :
                                     *
SP|P16410|CTLA4_HUMANO    FLDDSICT-----GTSSGNQVNLTI---QGLRAMDTGLYICKVELMYPYPYVLGIG----- 144
TR|G7PL88|G7PL88_MACEFA    FLDDSICT-----GTSSGNQVNLTI---QGLRAMDTGLYICKVELMYPYPYVLGIG----- 144
SP|P10747|CD28_HUMANO    SKTGFNCD-----GKLGNESTVTVL---QNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPPYLDNPK----- 127
SP|Q9Y6W8|ICOS_HUMANO    IKSLKFCH-----SQLSNNSVSFFL---YNLDHSHANYFPCNLISIFDPPPEKVTLT----- 124
SP|Q7Z6A9|BTLA_HUMANO    -----TSNKEKNLSFFLHFPEVLPNDNGSYRCSANFQSNL---IE----- 125
SP|Q15116|PDCD1_HUMANO    SQFGQDCRFVTVQLPNGRDFHMSV---VRARRNDSGTYLCGAIISLAPKAQIKESLRNELR 143
                                     ... : :
                                     * *

```

Figura 17C

```

SPI|P16410|CTLA4_HUMANO_NGTQIVVIDP-----EPCPDS-----DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL--S-KML 190
TR|G7FL88|G7FL88_MACEA_NGTQIVVIDP-----EPCPDS-----DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL--S-KML 190
SPI|P10747|CD28_HUMANO_SNGTIIHVRGK-----HLCPSPLFPGPSKPFVWVVGVLACYSLLVTVAFI--IFWVR 180
SPI|Q9Y6W8|ICOS_HUMANO--GGYLHIYES-----QLCCQL-----KFMLPICAA---FVWCILGCIL--ICWLT 165
SPI|Q7Z6A9|BTLA_HUMANO_SHSITLVVTVDKSASERPSKDEMSR-PWLLYRLILPLGG---LPLLITTCFCLFCCLRR 180
SPI|Q15116|PDCD1_HUMANO_VTERRAEVPTA-----HPSPSRPAG-QQTIVVGVGVLGSLVLLVWVLAV--ICSRA 195
      :
      . . .
      . . .
SPI|P16410|CTLA4_HUMANO_KKRSP-----LTTGVVVKMPPE-----PEC-EKQFQFYFIPIN----- 223
TR|G7FL88|G7FL88_MACEA_KKRSP-----LTTGVVVKMPPE-----PEC-EKQFQFYFIPIN----- 223
SPI|P10747|CD28_HUMANO_SKRSR-----LLHSDYMNMTPRR-----PGTRKHYPYAPPRD--FAAYRS----- 220
SPI|Q9Y6W8|ICOS_HUMANO_KKYSVSSVHDPNGEYMFMRVNV-----TAKKRLTDVTL----- 199
SPI|Q7Z6A9|BTLA_HUMANO_HQKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMOEGS 240
SPI|Q15116|PDCD1_HUMANO_ARG-----TIG-----ARR-----TGQP-LKEDPSAVEVF--SVDYGEDLDQWREKT 234
      :
      .
      .
      .
SPI|P16410|CTLA4_HUMANO-----
TR|G7FL88|G7FL88_MACEA-----
SPI|P10747|CD28_HUMANO-----
SPI|Q9Y6W8|ICOS_HUMANO-----
SPI|Q7Z6A9|BTLA_HUMANO_EVYSNFCLENKP--GIVYASLNHSVIGNSRLARNVKEAPTEYASI-----CVRS- 289
SPI|Q15116|PDCD1_HUMANO_PEPFVPCVPEQTEYATIVFP-----SGMGTSSPARGSADGERSAQPLRPEDGHCWFL 288

```

Figura 17E

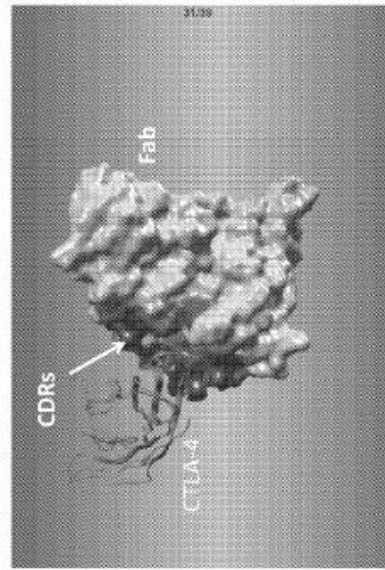


Figura 17D

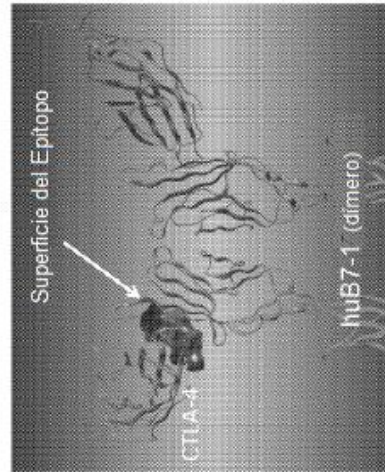


Figura 18A

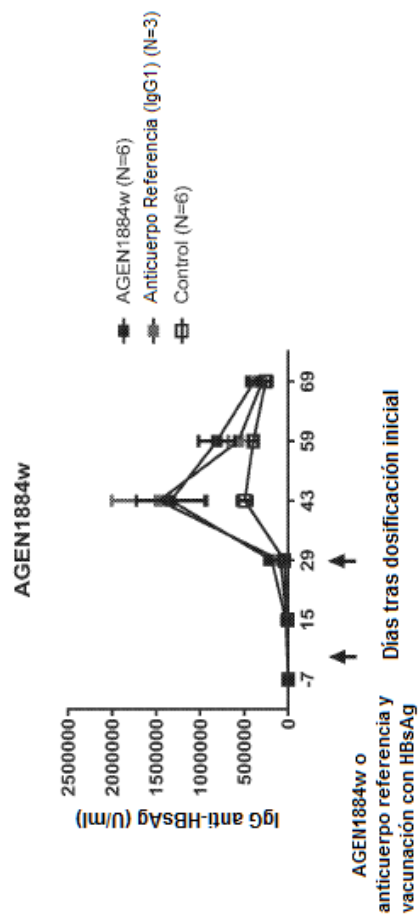


Figura 18B

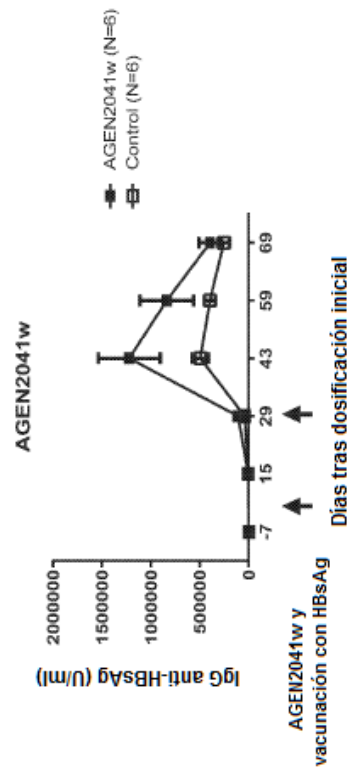


Figura 19A

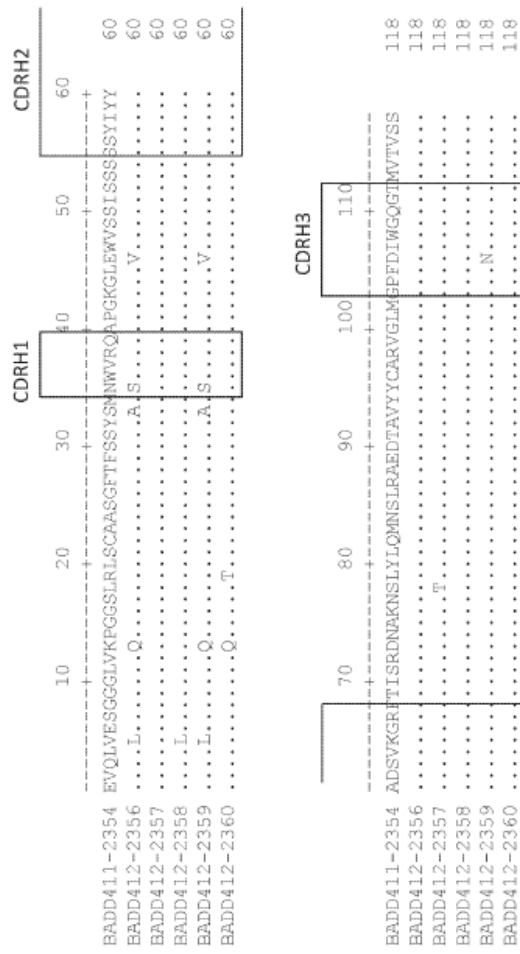


Figura 19 B

	10	20	30	40	50	60
BADD412-2376	EIVLTQSGTILSLSPGERATLSCRASDSYSRYLGNWYQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPD					60
BADD412-2367	A.....	GT.A...H.V.....				60
BADD412-2382	A.....	S.A.....S.....AT.S.....				60
BADD412-2384	A..F.....	S.A.....S.....S.....				60
BADD412-2390	A..V.....	S.A.....S.A.....A.....				60
BADD412-2393	A.....	S.A.....N.....A.....				60

	70	80	90	100	
BADD412-2376	RFGSGSGTDFLTITRLPEDEFAVYCOQYESSPWTFGQTKVEIK				107
BADD412-2367	S.....				107
BADD412-2382	V.....S.....T.....				107
BADD412-2384	F.S.....F.P..D..				107
BADD412-2390	A.....S.....				107
BADD412-2393	SS.....F.P..D..				107

Figura 20A

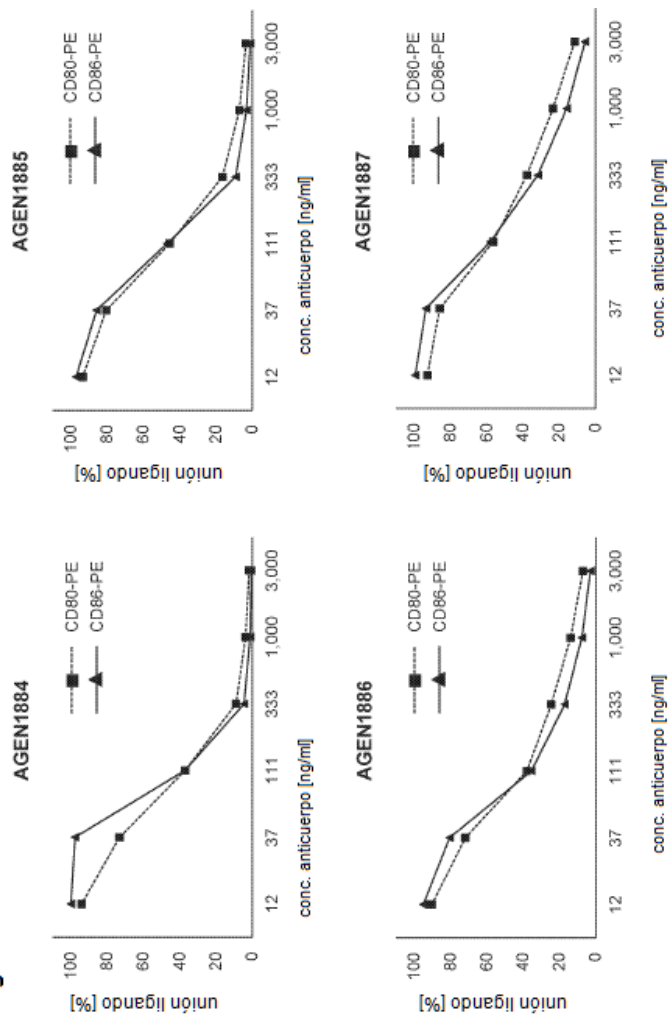


Figura 20B

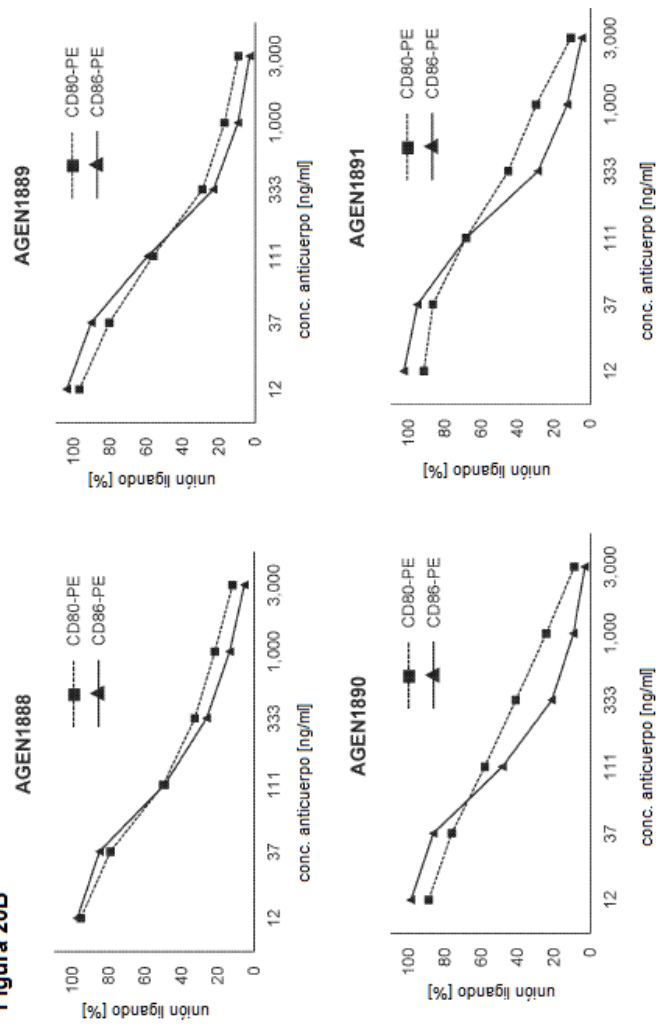


Figura 20C

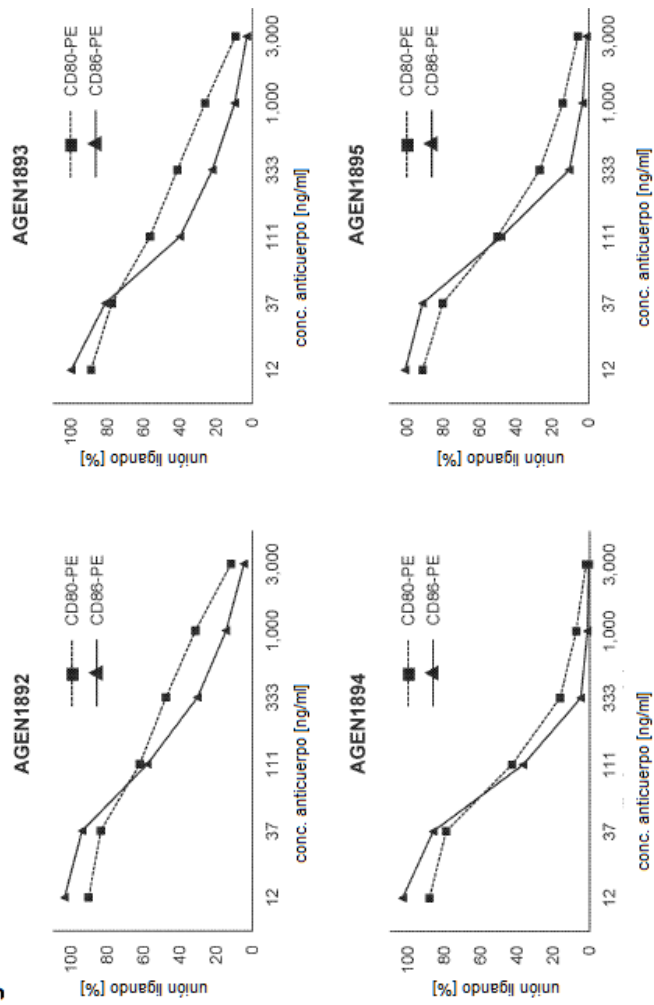


Figura 20D

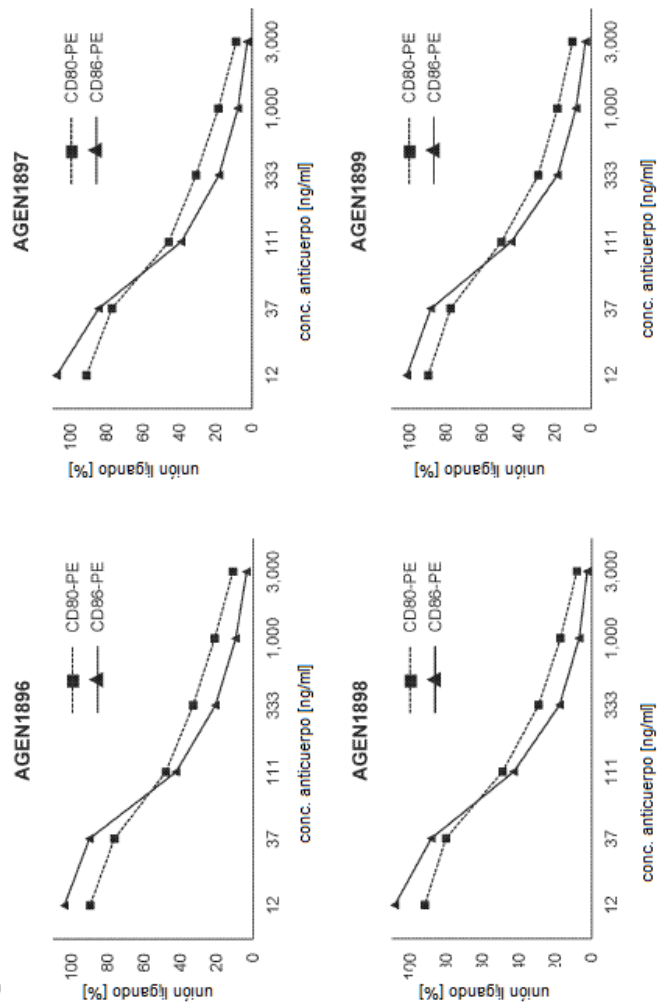


Figura 20E

