

1. DOMENIU

Prezenta dezvoltare se referă la anticorpi care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și anticorpi pentru utilizări ale acestora.

2. BAZE

Limfocitele T sunt esențiale pentru răspunsul imun adaptiv la antigen. Cel puțin două semnale sunt necesare pentru activarea completă a celulelor T naive (Bretscher 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96: 185-90). Un prim semnal specific antigenului este furnizat prin interacțiunea receptorului celulei T (TCR) cu complexul MHC/peptidă pe o celulă prezentatoare de antigen (APC). Un al doilea semnal co-stimulator este furnizat de interacțiunile dintre receptori de pe celula T și liganzii acestora de pe o celulă prezentatoare de antigen (APC). Angajarea atât a interacțiunilor TCR/MHC, cât și a celor co-stimulatoare conduce la activarea celulelor T printr-o serie de căi intracelulare, incluzând calciu-calcineurină și protein kinaza activată de mitogen RAS și activarea ulterioară a factorilor de transcripție pentru o serie de compuși efectori, inclusiv citokine cum ar fi IL-2. Aceste evenimente conduc la proliferarea celulelor T, generarea unui bazin de celule T helper (TH) CD4+ și expansiunea celulelor T citotoxice CD8+ activate. Co-stimularea nu numai că este esențială pentru activarea completă a celulelor T, ci absența acesteia în timpul angajării TCR/MHC are ca rezultat anergie și/sau apoptoză.

În reglarea celulelor T sunt implicate mai multe căi co-stimulatoare pozitive și negative; cu toate acestea, cele mai importante sunt între CD28 pe celulele T și B7-1 (CD80) și B7-2 (CD86) pe APC-uri. CD28 promovează diferențierea celulelor T în celulele fenotip TH1 și îmbunătățește producția de anticorp de către celulele B și activarea celulelor T. B7-1 și B7-2, exprimate pe APC-uri, cum ar fi celulele dendritice (DC) și celulele B, au funcții care se suprapun, dar distincte. B7-2 este exprimat constitutiv și este suprareglat rapid pe APC-uri coincident cu angajarea TCR/MHC (semnal 1). Expresia B7-1 este foarte scăzută pe celula în repaus, dar este indusă tipic după stimularea prelungită a celulelor T. Aceste diferențe sugerează faptul că, în timp ce B7-2 poate fi important în inițializarea activării celulelor T, B7-1 poate juca un rol mai important în perpetuarea răspunsului imun.

După activarea celulelor T, receptorul regulator negativ Antigenul 4 al limfocitelor T citotoxice (CTLA-4) este suprareglat pe celulele T (Alegre și colab., 2001, Nat Rev Immunol 1:220-8). CTLA-4 este omolog structural cu CD28, dar se leagă mai strâns atât la liganzii B7-1, cât și la B7-2. CTLA-4 inhibă răspunsul imun în mai multe moduri: concurează cu CD28 pentru liganzii B7 și astfel blochează co-stimularea; semnalează negativ pentru a inhiba activarea celulelor T; și poate captura CD80 și CD86 din celulele opuse prin trans-endocitoză, rezultând o costimulare afectată prin intermediul CD28 (Krummel și Allison, 1995, J Exp Med 182:459-465; Walunas și colab., 1994, Immunity 1:405-413; Qureshi și colab., 2011, Science 332:600-603). WO 2009/100140 A1 dezvăluie anticorpi monoclonali anti-CTLA-4 cu blocare redusă a legării CTLA-4 la B7. WO 2012/120125 A1 dezvăluie anticorpi anti-CTLA-4 umanizați. EP 1 262 193 A1 dezvăluie utilizarea anticorpilor umani anti-CTLA-4 pentru tratamentul cancerului. WO 2016/168809 A1 dezvăluie combinații de anticorpi care țintesc LGALS3BP și o țintă de punct de control imun, cum ar fi PDL1, PD1 sau CTLA4. WO 2016/179576 A1 dezvăluie utilizarea anticorpilor sau a moleculelor mici care se leagă și vizează atât ABCB5, cât și o moleculă de punct de control imun pentru tratamentul cancerului. Elise Drouin ȘI COLAB: "AGEN1884 și AGEN2041: Two functionally distinct anti-CTLA-4 antagonist antibodies", 1 August 2016, care se poate descărca de pe Internet la URL: http://agenusbio.com/wp-content/uploads/2016/08/CTLA-4_AACR_04082016_FINAL_POSTER.pdf, dezvăluie denumirea de anticorp "AGEN1884" ca fiind un anticorp anti CTLA-4 și funcția sa de a trata tumorile.

Având în vedere rolul esențial al căii de co-stimulare B7 în promovarea și menținerea unui răspuns imun, agenții terapeutici concepuți astfel încât să antagonizeze această cale sunt promițători pentru tratamentul bolilor și tulburărilor autoimune.

3. DESCRIERE PE SCURT

Invenția este definită de revendicările anexate. Orice parte a descrierii care nu intră în sfera revendicărilor anexate are doar scop ilustrativ. În special, orice obiect la

care se face referire ca "dezvăluire" care nu intră în scopul revendicărilor anexate nu face parte din invenție.

Orice referiri în descriere la metode de tratament se referă la anticorpii sau compozițiile farmaceutice conform prezentei invenții pentru utilizarea într-o metodă de tratament a corpului uman (sau animal) prin terapie.

Prezenta dezvăluire furnizează anticorpi care se leagă în mod specific la CTLA-4 uman și antagonizează funcția CTLA-4, *de exemplu*, deprimarea imună mediată de CTLA-4. De asemenea, sunt furnizate compoziții farmaceutice care cuprind acești anticorpi, acizi nucleici care codifică acești anticorpi, vectori de exprimare și celule gazdă pentru obținerea acestor anticorpi și metode de tratare a unui subiect utilizând acești anticorpi. Anticorpii descriși aici sunt deosebit de utili pentru creșterea activării celulelor T ca răspuns la un antigen (*de exemplu*, un antigen tumoral sau un antigen de boală infecțioasă) și/sau scăderea deprimării imune mediate de Treg și, prin urmare, pentru tratarea cancerului la un subiect sau pentru tratarea sau prevenirea unei boli infecțioase la un subiect.

În consecință, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând regiunile de determinare a complementarității CDRH1, CDRH2 și CDRH3 și o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând regiunile de determinare a complementarității CDRL1, CDRL2 și CDRL3, în care:

- (a) CDRH1 cuprinde secvența de aminoacizi a SYSMN (SECV ID NR: 10);
- (b) CDRH2 cuprinde secvența de aminoacizi a SSSSSSYIYYXSVKG (SECV ID NR: 18), în care X este E sau D;
- (c) CDRH3 cuprinde secvența de aminoacizi a VGLXGPFDI (SECV ID NR: 19), în care X este F sau M;
- (d) CDRL1 cuprinde secvența de aminoacizi a RASQSVSRYL (SECV ID NR: 15);
- (e) CDRL2 cuprinde secvența de aminoacizi a GASTRAT (SECV ID NR: 16); și

(f) CDRL3 cuprinde secvența de aminoacizi a QQYGSSPWT (SECV ID NR: 17), și în care secvențele CDRH1, CDRH2, și CDRH3 ale anticorpului nu sunt SECV ID NR: 10, 11, și respectiv 13.

Într-o anumită dezvăluire, CDRH2 cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 11. Într-o anumită dezvăluire, CDRH2 cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 12. Într-o anumită dezvăluire, CDRH3 cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 13. Într-o anumită dezvăluire, CDRH3 cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 14. Într-o anumită dezvăluire, CDRH1, CDRH2, și CDRH3 cuprind secvențele de aminoacizi ale CDRH1, CDRH2, și CDRH3 specificate în SECV ID NR: 10, 11, și 14; 10, 12, și 13; sau 10, 12, și respectiv 14. Într-o anumită dezvăluire, CDRH1, CDRH2, și CDRH3 cuprind secvențele de aminoacizi ale CDRH1, CDRH2, și CDRH3 specificate în SECV ID NR: 10, 12, și respectiv 14. Într-o anumită dezvăluire, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, și CDRL3 cuprind secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 10, 11, 14, 15, 16, și 17; 10, 12, 13, 15, 16, și 17; sau 10, 12, 14, 15, 16, și respectiv 17. Într-o anumită dezvăluire, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, și CDRL3 cuprind secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 10, 12, 14, 15, 16, și respectiv 17.

Prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 uman, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde regiunile de determinare a complementarității CDRH1, CDRH2 și CDRH3 și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde regiunile de determinare a complementarității CDRL1, CDRL2 și CDRL3, în care:

- (a) CDRH1 cuprinde secvența de aminoacizi a SYSMN (SECV ID NR: 10);
- (b) CDRH2 cuprinde secvența de aminoacizi a SSSSSSYIYYAXSVKG (SECV ID NR: 18), în care X este E sau D;
- (c) CDRH3 cuprinde secvența de aminoacizi a VGLXGPFDI (SECV ID NR: 19), în care X este F sau M;
- (d) CDRL1 cuprinde secvența de aminoacizi a RASQSVSRYLG (SECV ID NR: 15);

(e) CDRL2 cuprinde secvența de aminoacizi a GASTRAT (SECV ID NR: 16); și

(f) CDRL3 cuprinde secvența de aminoacizi a QQYGSSPWT (SECV ID NR: 17),

și în care secvențele CDRH1, CDRH2, și CDRH3 ale anticorpului nu sunt SECV ID NR: 10, 11, și respectiv 13.

Într-o anumită dezvăluire, CDRH2 cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 11. Într-o anumită dezvăluire, CDRH2 cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 12. Într-o anumită dezvăluire, CDRH3 cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 13. Într-o anumită dezvăluire, CDRH3 cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 14. Într-o anumită dezvăluire, CDRH1, CDRH2, și CDRH3 cuprind secvențele de aminoacizi ale CDRH1, CDRH2, și CDRH3 specificate în SECV ID NR: 10, 11, și 14; 10, 12, și 13; sau 10, 12, și respectiv 14. Într-o anumită dezvăluire, CDRH1, CDRH2, și CDRH3 cuprind secvențele de aminoacizi ale CDRH1, CDRH2, și CDRH3 specificate în SECV ID NR: 10, 12, și respectiv 14. Într-o anumită dezvăluire, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, și CDRL3 cuprind secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 10, 11, 14, 15, 16, și 17; 10, 12, 13, 15, 16, și 17; sau 10, 12, 14, 15, 16, și respectiv 17. Într-o anumită dezvăluire, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, și CDRL3 cuprind secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 10, 12, 14, 15, 16, și respectiv 17.

În prezenta dezvăluire este furnizat un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 uman, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde regiunile de determinare a complementarității CDRH1, CDRH2 și CDRH3 și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde regiunile de determinare a complementarității CDRL1, CDRL2, și CDRL3, în care CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, și CDRL3 cuprind secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 10, 12, 14, 15, 16, și respectiv 17.

Prezenta invenție se referă la un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 uman, anticorpul cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu în care secvența de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu constă din secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 8 și o regiune variabilă a lanțului ușor în care secvența de

aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor constă din secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 9; și

în care anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu a IgG₁ uman, în care secvența de aminoacizi a regiunii constante a lanțului greu de IgG₁ uman cuprinde mutații S239D/A330L/I332E, numerotate conform sistemului de numerotare EU.

Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 20. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, sau 100% identică cu o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 2 și 4-8. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, sau 100% identică cu o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 3. Într-o anumită dezvăluire, regiunea variabilă a lanțului greu cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 2 și 4-8. Regiunea variabilă a lanțului greu a anticorpului conform invenției cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 8. Într-o anumită dezvăluire, regiunea variabilă a lanțului greu cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 3. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 23. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 24. În anumite variante de realizare, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 25. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 26. Anticorpul poate cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care are o secvență de aminoacizi derivată de la o secvență a liniei germinale de IGHV3-21 uman (de exemplu, IGHV3-21*01, de exemplu, având secvența de aminoacizi cu SECV ID NR: 21).

Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, sau 100% identică cu secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 9. Anticorpul conform invenției cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 9. În anumite variante de realizare, anticorpul cuprinde

un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27. Anticorpul poate cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor având o secvență de aminoacizi derivată de la o secvență a liniei germinale de IGKV3-20 uman (de exemplu, IGKV3-20*01, de exemplu, având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 22).

Este dezvăluit un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 uman, anticorpul cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu având o secvență de aminoacizi derivată de la o secvență a liniei germinal de IGHV3-21 uman (de exemplu, IGHV3-21*01, de exemplu, având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 21), în care regiunea variabilă a lanțului greu cuprinde secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 14. Este dezvăluit faptul că anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor având o secvență de aminoacizi derivată de la o secvență a liniei germinale de IGKV3-20 uman (de exemplu, IGKV3-20*01, de exemplu, având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 22).

Prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 uman, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 2-8. Anticorpul conform invenției cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 8. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 23-26. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 23. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 24. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 25. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 26.

Este dezvăluit un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 uman, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune variabilă a lanțului ușor, în care regiunea variabilă a lanțului greu și regiunea variabilă a lanțului ușor cuprind secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 2 și 9; 3 și 9; 4 și 9; 5 și 9; 6 și 9; 7 și 9; sau 8 și respectiv 9. Prezenta invenție se referă la un anticorp izolat care se

leagă în mod specific la CTLA-4 uman, anticorpul cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu în care secvența de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 8 și o regiune variabilă a lanțului ușor în care secvența de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 9; și

în care anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu de IgG₁ uman, în care secvența de aminoacizi a regiunii constante a lanțului greu de IgG₁ uman o cuprinde mutații S239D/A330L/I332E, numerotate conform sistemului de numerotare EU.

Anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 8 și o regiune variabilă a lanțului ușor care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 9. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 23; și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 24; și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27. În anumite variante de realizare, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 25; și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 26; și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27.

Este dezvoltat un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 uman, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu având o secvență de aminoacizi derivată de la o secvență a liniei germinale de IGHV3-21*01 uman (de exemplu, IGHV3-21*01, de exemplu, având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 21); și o regiune variabilă a lanțului ușor având o secvență de aminoacizi derivată de la o secvență a liniei germinale de IGKV3-20* 01 uman (de exemplu, IGKV3-20*01, de exemplu, având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 22).

Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu selectată din grupul care constă din IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, și IgA₂ uman. Anticorpul conform invenției cuprinde o regiune constantă a lanțului greu de IgG₁ uman, în care secvența de aminoacizi a regiunii constante a lanțului greu de IgG₁ uman

cuprinde mutații S239D/A330L/I332E, numerotate conform sistemului de numerotare EU. În anumite variante de realizare, anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului ușor selectată din grupul care constă din Igx și Igl uman.

Anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu de IgG₁. Este dezvăluit faptul că anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 28. Este dezvăluit faptul că anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 29. Secvența de aminoacizi a regiunii constante a lanțului greu a IgG₁ cuprinde mutații S239D/A330L/I332E, numerotate conform sistemului de numerotare EU. În anumite variante de realizare, anticorpul cuprinde a o regiune constantă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 30. Într-o anumită dezvoltare, secvența de aminoacizi a regiunii constante a lanțului greu al IgG₁ cuprinde mutații L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde a o regiune constantă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 31. Regiunea constantă a lanțului greu a IgG₁ poate fi IgG₁ afucozilată.

Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu a IgG umane care este o variantă a unei regiuni constante a lanțului greu al IgG uman de tip sălbatic, în regiunea constantă a lanțului greu a variantei de IgG uman se leagă la FcγRIIIA cu o afinitate mai ridicată decât se leagă la FcγRIIIA o regiune constantă a lanțului greu de IgG uman de tip sălbatic. Varianta regiunii constante a lanțului greu de IgG uman o poate fi o variantă a regiunii constante a lanțului greu de IgG₁ uman.

În anumite variante de realizare, anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului ușor selectată din grupul care constă din Igx și Igl uman. Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului ușor Igk. Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 32.

Este dezvăluit un anticorp izolat care concurează încrucișat pentru legarea la CTLA-4 uman cu un anticorp descris aici. Este dezvăluit un anticorp izolat care concurează încrucișat pentru legarea la CTLA-4 uman cu un anticorp care cuprinde

secvențele de aminoacizi ale regiunii variabile ale lanțului greu și ușor, specificate în SECV ID NR: 8 și, respectiv, 9.

Este dezvoltat un anticorp izolat care se leagă la același epitop pe CTLA-4 uman ca un anticorp descris aici. Este dezvoltat un anticorp izolat care se leagă la același epitop pe CTLA-4 uman ca un anticorp care cuprinde secvențele de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu și ușor, specificate în SECV ID NR: 8 și, respectiv, 9.

Este dezvoltat un anticorp izolat care se leagă, *de exemplu*, se leagă în mod specific, la un epitop al CTLA-4 uman. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă dintr-o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 34-39. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 37. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 36. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 35. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 34. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 38. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 39.

Este dezvoltat un anticorp sau anticorp izolat care se leagă în mod specific la același epitop al CTLA-4 uman ca orice anticorp conform prezentei invenții. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă dintr-o secvență de aminoacizi selectată din grupul care constă din SECV ID NR: 34-39. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 37. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 36. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 35. Într-o anumită

dezvăluire, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 34. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 38. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul se leagă la un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman care constă din secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 39.

Este dezvăluit un anticorp care, atunci când este legat la o proteină CTLA-4 umană sau un fragment al acesteia, *de exemplu*, care cuprinde secvența de aminoacizi cu resturile 37-162 ale SECV ID NR: 33, reduce schimbul de hidrogen/deuteriu într-o regiune care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 34 în raport cu schimbul de hidrogen/deuteriu în regiunea care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 34 în absența anticorpului, determinată printr-un test de hidrogen/deuteriu. Într-un alt aspect, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp care, atunci când este legat la o proteină CTLA-4 umană sau un fragment al acesteia, *de exemplu*, care cuprinde secvența de aminoacizi cu resturile 37-162 din SECV ID NR: 33, reduce schimbul de hidrogen/deuteriu în o regiune care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35 în raport cu schimbul de hidrogen/deuteriu în regiunea care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35 în absența anticorpului, așa cum este determinat printr-un test de hidrogen/deuteriu. Într-un alt aspect, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp care, atunci când este legat la o proteină CTLA-4 umană sau fragment al acesteia, *de exemplu*, care cuprinde secvența de aminoacizi cu resturile 37-162 ale SECV ID NR: 33, reduce schimbul de hidrogen/deuteriu într-o regiune care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 36 în raport cu schimbul de hidrogen/deuteriu în regiunea care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 36 în absența anticorpului, așa cum este determinat printr-un test de hidrogen/deuteriu. Într-un alt aspect, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp care, atunci când este legat la o proteină CTLA-4 umană sau fragment al acesteia, *de exemplu*, care cuprinde secvența de aminoacizi cu resturile 37-162 ale SECV ID NR: 33, reduce schimbul de hidrogen/deuteriu într-o regiune care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 37 în raport cu schimbul de hidrogen/deuteriu în regiunea care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 37 în absența anticorpului, așa cum este determinat printr-un test de hidrogen/deuteriu. Într-un alt aspect, prezenta

dezvăluire furnizează un anticorp care, atunci când este legat la o proteină CTLA-4 umană sau fragment al acesteia, *de exemplu*, care cuprinde secvența de aminoacizi cu resturile 37-162 ale SECV ID NR: 33, reduce schimbul de hidrogen/deuteriu într-o regiune care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 38 în raport cu schimbul de hidrogen/deuteriu în regiunea care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 38 în absența anticorpului, așa cum este determinat printr-un test de hidrogen/deuteriu. Într-un alt aspect, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp care, atunci când este legat la o proteină CTLA-4 umană sau fragment al acesteia, *de exemplu*, care cuprinde secvența de aminoacizi cu resturile 37-162 ale SECV ID NR: 33, reduce schimbul de hidrogen/deuteriu într-o regiune care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 39 în raport cu schimbul de hidrogen/deuteriu în regiunea care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 39 în absența anticorpului, așa cum este determinat printr-un test de hidrogen/deuteriu.

Într-un alt aspect, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp sau anticorp izolat care se leagă în mod specific la același epitop a CTLA-4 uman ca orice anticorp conform prezentei invenții. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul, atunci când este legat la o proteină CTLA-4 umană sau fragment al acesteia, *de exemplu*, care cuprinde secvența de aminoacizi cu resturile 37-162 ale SECV ID NR: 33, reduce schimbul de hidrogen/deuteriu într-o regiune care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 34 în raport cu schimbul de hidrogen/deuteriu în regiunea care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 34 în absența anticorpului, așa cum este determinat printr-un test de hidrogen/deuteriu. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul, atunci când este legat la o proteină CTLA-4 umană sau fragment al acesteia, *de exemplu*, care cuprinde secvența de aminoacizi cu resturile 37-162 ale SECV ID NR: 33, reduce schimbul de hidrogen/deuteriu într-o regiune care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35 în raport cu schimbul de hidrogen/deuteriu în regiunea care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 35 în absența anticorpului, așa cum este determinat printr-un test de hidrogen/deuteriu. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul, atunci când este legat la o proteină CTLA-4 umană sau fragment al acesteia, *de exemplu*, care cuprinde secvența de aminoacizi cu resturile 37-162 ale SECV ID NR: 33, reduce schimbul de hidrogen/deuteriu într-o regiune care constă din secvența de aminoacizi specificată în

SECV ID NR: 36 în raport cu schimbul de hidrogen/deuteriu în regiunea care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 36 în absența anticorpului, așa cum este determinat printr-un test de hidrogen/deuteriu. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul, atunci când este legat la o proteină CTLA-4 umană sau fragment al acesteia, de exemplu, care cuprinde secvența de aminoacizi cu resturile 37-162 ale SECV ID NR: 33, reduce schimbul de hidrogen/deuteriu într-o regiune care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 37 în raport cu schimbul de hidrogen/deuteriu în regiunea care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 37 în absența anticorpului, așa cum este determinat printr-un test de hidrogen/deuteriu. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul, atunci când este legat la o proteină CTLA-4 umană sau fragment al acesteia, *de exemplu*, care cuprinde secvența de aminoacizi cu resturile 37-162 ale SECV ID NR: 33, reduce schimbul de hidrogen/deuteriu într-o regiune care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 38 în raport cu schimbul de hidrogen/deuteriu în regiunea care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 38 în absența anticorpului, așa cum este determinat printr-un test de hidrogen/deuteriu. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul, atunci când este legat la o proteină CTLA-4 umană sau fragment al acesteia, *de exemplu*, care cuprinde secvența de aminoacizi cu resturile 37-162 ale SECV ID NR: 33, reduce schimbul de hidrogen/deuteriu într-o regiune care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 39 în raport cu schimbul de hidrogen/deuteriu în regiunea care constă din secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 39 în absența anticorpului, așa cum este determinat printr-un test de hidrogen/deuteriu.

În anumite variante de realizare, anticorpul este un anticorp uman. Într-o anumită variantă de realizare, anticorpul este un anticorp bispecific.

Anticorpul poate fi antagonist la CTLA-4 uman. Anticorpul poate dezactiva, reduce sau inhiba o activitate a CTLA-4 uman. Anticorpul poate inhiba legarea CTLA-4 uman la CD80 uman sau CD86 uman. Anticorpul poate induce producția de IL-2 de către celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC-uri) stimulate cu enterotoxina A stafilococică (SEA).

Anticorpul poate fi conjugat la un agent citotoxic, agent citostatic, toxină, radionuclid sau etichetă detectabilă.

Restul de aminoacid N-terminal al regiunii variabile a lanțului greu și/sau a regiunii variabile a lanțului ușor a anticorpului poate fi transformat în piroglutamat.

Este dezvăluit un anticorp conform prezentei invenții pentru utilizarea ca un medicament.

Este dezvăluită utilizarea unui anticorp conform prezentei invenții pentru prepararea compozițiilor farmaceutice sau a unor medicamente pentru imunoterapie. Imunoterapia poate fi pentru creșterea activării celulelor T ca răspuns la un antigen la un subiect, opțional pentru tratarea cancerului sau tratarea sau prevenirea bolilor infecțioase.

Un anticorp conform prezentei invenții poate fi pentru utilizarea ca un diagnostic.

Un anticorp conform prezentei invenții poate fi utilizat pentru detecția *in vitro* a CTLA-4 umană într-o probă biologică.

Într-un alt aspect, prezenta dezvăluire furnizează o compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic.

Într-un alt aspect, prezenta dezvăluire furnizează o polinucleotidă izolată care codifică un lanț greu și ușor al unui anticorp conform invenției. Într-un alt aspect, prezenta dezvăluire furnizează un vector care cuprinde polinucleotida. Într-un alt aspect, prezenta dezvăluire furnizează o celulă gazdă recombinantă care cuprinde polinucleotida sau vectorul. Într-un alt aspect, prezenta dezvăluire furnizează o metodă de producere a unui anticorp care se leagă la CTLA-4 uman, metoda cuprinzând cultivarea celulei gazdă astfel încât polinucleotida să fie exprimată și anticorpul să fie produs.

Este dezvăluită o metodă de creștere a activării celulelor T ca răspuns la un antigen la un subiect, metodă care cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente de anticorp anti-CTLA-4 sau dintr-o compoziție farmaceutică descrisă aici. Este dezvăluită o metodă de tratare a cancerului la un subiect, metoda care cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-CTLA-4 sau dintr-o compoziție farmaceutică descrisă aici. Prezenta invenție se referă în plus la un anticorp izolat conform invenției, sau la compoziția farmaceutică conform invenției, pentru utilizarea într-o metodă de tratare a cancerului la un subiect. În anumite variante de realizare, subiectul are cancer. În anumite variante de realizare, subiectul are o tumoră metastatică sau avansată local (de exemplu, tumoră solidă). În anumite variante de realizare, cancerul este tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici ca primă terapie pentru cancer după diagnosticarea tumorii metastatice sau avansate local (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5 sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8 sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8 sau 12 luni după diagnosticare). În anumite variante de realizare, cancerul este tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici ca primă terapie pentru cancer după diagnosticarea progresării tumorii (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5 sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8 sau 12 luni după diagnosticul progresării tumorale) care a avut loc în pofida tratamentului anterior al tumorii cu o terapie diferită a cancerului, în care opțional metoda descrisă aici este furnizată ca a doua terapie administrată pentru cancer. În anumite variante de realizare, cancerul este tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici ca primă terapie a cancerului după diagnosticarea toxicității unei terapii diferite a cancerului (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5 sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8 sau 12 luni după diagnosticarea toxicității diferitelor terapii pentru cancer), opțional, în care metoda descrisă aici este furnizată ca a doua terapie administrată pentru cancer. În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este un cancer metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoră solidă) pentru care nu este disponibilă nicio terapie standard. În alte variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este un cancer metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoră solidă) pentru care o terapie standard a eșuat (*adică*, cancerul a progresat după terapia standard). În anumite variante de realizare, o terapie eșuează dacă cancerul este refractar la terapie. În anumite variante de realizare, o terapie eșuează dacă cancerul recidivează după ce răspunde, total sau parțial, la terapie. În

anumite variante de realizare, cancerul metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoarea solidă) a fost confirmat histologic sau citologic.

În anumite variante de realizare, cancerul exprimă PD-L1. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1% (de exemplu, cel puțin 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, sau 90%). În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 5%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 25%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 50%.

În anumite variante de realizare, tumoarea metastatică sau avansată local exprimă PD-L1. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de tumoarea metastatică sau avansată local care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1% (de exemplu, cel puțin 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, sau 90%). În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de tumoarea metastatică sau avansată local care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de tumoarea metastatică sau avansată local care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 5%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de tumoarea metastatică sau avansată local care prezintă exprimare

membrana detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 25%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de tumoarea metastatică sau avansată local care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 50%.

În anumite variante de realizare, cancerul este un cancer de col uterin. În anumite variante de realizare, cancerul este un cancer metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoare solidă). În anumite variante de realizare, cancerul metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoare solidă) este un carcinom cu celule scuamoase nerezecabil, un carcinom adenoscuamos sau un adenocarcinom al colului uterin metastatic sau avansat local. În anumite variante de realizare, nu este disponibilă nicio terapie standard pentru cancerul (de exemplu, cancer de col uterin) sau tumoarea metastatică sau avansată local (de exemplu, tumoare solidă). În anumite variante de realizare, cancerul (de exemplu, cancer de col uterin) sau tumoare metastatică sau avansată local (de exemplu, tumoare solidă) este refractar la terapia standard. În anumite variante de realizare, cancerul (de exemplu, cancer de col uterin) sau tumoare metastatică sau avansată local (de exemplu, tumoare solidă) a recidivat după o terapie standard. În anumite variante de realizare, terapia standard cuprinde o chimioterapie care conține platină. În anumite variante de realizare, terapia standard este un dublet care conține platină. În anumite variante de realizare, cancerul (de exemplu, cancer de col uterin) este un carcinom cu celule scuamoase, carcinom adenoscuamos, sau adenocarcinom de col uterin metastatic sau avansat local, nerezectabil care a recidivat după un dublet care conține platină administrat pentru tratamentul bolii avansate (recurente, nerezectabile, sau metastatice). În anumite variante de realizare, cancerul (de exemplu, cancer de col uterin) sau tumoare metastatică sau avansată local este HPV pozitiv. În anumite variante de realizare, cancerul sau tumora solidă metastatică sau avansată local este cancerul capului și gâtului, melanomul, carcinomul cu celule renale, carcinomul urotelial sau carcinomul endometrial. În anumite variante de realizare, cancerul (de exemplu, cancer de col uterin) sau tumoarea solidă metastatică sau avansată local este asociată cu instabilitatea microsatelitului.

În anumite variante de realizare, subiectul are cancer de col uterin (de exemplu,

un carcinom cu celule scuamoase, carcinom adenoscuamos, sau adenocarcinom al colului uterin metastatic sau avansat local, neresectabil), și metoda cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente de anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4 ca primă terapie pentru cancer după diagnosticarea cancerului de col uterin (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5 sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8 sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8 sau 12 luni după diagnosticare), opțional în care anticorpul anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau compoziția farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4 este administrat la doza și frecvența selectate din grupul care constă din 0,3 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 1 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 3 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 0,3 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 1 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 3 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 0,3 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni, 1 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni și 3 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni. În anumite variante de realizare, subiectul are cancer de col uterin (de exemplu, un carcinom cu celule scuamoase, carcinom adenoscuamos, sau adenocarcinom al colului uterin metastatic sau avansat local, neresectabil), și metoda cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente dintr-o combinație terapeutică care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4 și pembrolizumab ca primă terapie pentru cancer după diagnosticul cancerului de col uterin (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5 sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8 sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8 sau 12 luni după diagnosticare), opțional în care anticorpul anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau compoziția farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4, este administrată la doza și frecvența selectate dintre grupul format din 0,3 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 1 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 3 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 0,3 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 1 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 3 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 0,3 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni, 1 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni și 3 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni, și pembrolizumabul este administrat la 200 mg la fiecare trei săptămâni.

În anumite variante de realizare, cancerul este un cancer pulmonar cu celule

non-mici (NSCLC). În anumite variante de realizare, NSCLC-ul este un NSCLC stadiul IV. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1% (de exemplu, cel puțin 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, sau 90%). În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 5%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 25%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 50%. În anumite variante de realizare, NSCLC-ul nu are aberații tumorale genomice ale EGFR sau ALK. În anumite variante de realizare, NSCLC-ul metastatic sau avansat local nu are nicio mutație de sensibilizare a EGFR (de exemplu, mutație care poate fi tratată cu un inhibitor de tirozin kinază incluzând erlotinib, gefitinib, sau afatinib) sau de translocare a ALK. În anumite variante de realizare, subiectul nu a primit nici un tratament anterior cu chimioterapie sistemică pentru NSCLC.

În anumite variante de realizare, tumoarea solidă metastatică sau avansată local este un cancer pulmonar cu celule non-mici metastatic sau avansat local (NSCLC). În anumite variante de realizare, tumoarea solidă metastatică sau avansată local este un cancer pulmonar cu celule non-mici (NSCLC) metastatic. În anumite variante de realizare, tumoarea solidă metastatică sau avansată local este un NSCLC metastatic sau avansat local stadiul IV. În anumite variante de realizare, tumoarea solidă metastatică sau avansată local este un NSCLC metastatic stadiul IV. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC metastatic sau avansat local care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1% (de exemplu, cel puțin 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%,

50%, 60%, 70%, 80%, sau 90%). În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC metastatic sau avansat local care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC metastatic sau avansat local care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 5%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC metastatic sau avansat local care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 25%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC metastatic sau avansat local care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 50%. În anumite variante de realizare, NSCLC-ul metastatic sau avansat local nu are aberații tumorale genomice EGFR sau ALK. În anumite variante de realizare, subiectul nu a primit nici un tratament anterior cu chimioterapie sistemică pentru NSCLC metastatic sau avansat local.

În anumite variante de realizare, subiectul are NSCLC (de exemplu, NSCLC Stadiul IV, metastatic, sau avansat local), opțional în care procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC care prezintă o exprimare detectabilă (de exemplu, exprimare membranară, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, sau 90%, și metoda cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4, ca o primă terapie a cancerului după diagnosticare cancerului de col uterin (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticare), opțional în care anticorpul anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4, este administrat la o dozare și frecvență selectată din grupul care constă din 0,3 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 1 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 3 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 0,3 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 1 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 3 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 0,3 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni, 1

mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni, și 3 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni. În anumite variante de realizare, subiectul are NSCLC (de exemplu, NSCLC stadiul IV, metastatic, sau avansat local), opțional în care procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC care prezintă o exprimare detectabilă (de exemplu, exprimare membranară, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, sau 90%, și metoda cuprinde administrarea la subiect a unei combinații terapeutice care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4, și pembrolizumab ca o primă terapie a cancerului după diagnosticarea cancerului de col uterin (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticare), opțional în care anticorpul anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4, este administrat la o dozare și frecvență selectată din grupul care constă din 0,3 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 1 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 3 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 0,3 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 1 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 3 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 0,3 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni, 1 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni, și 3 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni, și pembrolizumabul este administrat la 200 mg la fiecare trei săptămâni.

În anumite variante de realizare, cancerul este un carcinom cutanat cu celule scuamoase (cSCC). În anumite variante de realizare, tumoarea solidă metastatică sau avansată local este un carcinom cutanat cu celule scuamoase Stadiul IV (cSCC). În anumite variante de realizare, cSCC-ul este diagnosticat histologic sau citologic în conformitate cu cea de-a opta ediție a manualului de evaluare al American Joint Committee on Cancer. În anumite variante de realizare, cSCC-ul nu este vindecabil cu radioterapie. În anumite variante de realizare, subiectul are cSCC (de exemplu, cSCC Stadiul IV), și metoda cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4, ca o primă terapie a cancerului după diagnosticarea cSCC-ului (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3,

4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticare), opțional în care anticorpul anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4, este administrat la o dozare și frecvență selectată din grupul care constă din 0,3 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 1 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 3 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 0,3 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 1 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 3 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 0,3 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni, 1 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni, și 3 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni. În anumite variante de realizare, subiectul are cSCC (de exemplu, cSCC stadiul IV), și metoda cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente dintr-o combinație terapeutică care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau dintr-o compoziție farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4, și pembrolizumab ca o primă terapie a cancerului după diagnosticarea cSCC-ului (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticare), opțional în care anticorpul anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4, este administrat la o dozare și frecvență selectată din grupul care constă din 0,3 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 1 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 3 mg/kg la fiecare patru săptămâni, 0,3 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 1 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 3 mg/kg la fiecare șase săptămâni, 0,3 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni, 1 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni, și 3 mg/kg la fiecare douăsprezece săptămâni, și pembrolizumabul este administrat la 200 mg la fiecare trei săptămâni.

În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este administrat intravenos. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este administrat intravenos la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, sau 10 mg/kg, opțional la un interval de o dată la fiecare două săptămâni. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este administrat intravenos la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, sau 10 mg/kg, opțional la un interval de o dată la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-

4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este administrat intravenos la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, sau 10 mg/kg, opțional la un interval de o dată la fiecare patru săptămâni. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este administrat intravenos la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, sau 10 mg/kg, opțional la un interval de o dată fiecare șase săptămâni. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este administrat intravenos la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, sau 10 mg/kg, opțional la un interval o dată la fiecare douăsprezece săptămâni. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este administrat intratumoral. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează intratumoral la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, sau 3 mg/kg, opțional la un interval de o dată la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează intratumoral la 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, sau 0,3 mg/kg, opțional la un interval de o dată la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează intratumoral la o doză care este de până la 5-ori, 10-ori, 20-ori, 30-ori, 40-ori, 50-ori, 60-ori, 70-ori, 80-ori, 90-ori, 100-ori, sau 200-ori mai scăzută decât o doză dată prin administrare sistemică. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează intratumoral la o doză care este de până la 10-ori mai scăzută decât o doză dată prin administrare sistemică. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează intratumoral la o doză care este de până la 100-ori mai scăzută decât o doză dată prin administrare sistemică. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează (de exemplu, intratumoral sau sistemic) ca o monoterapie. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează intratumoral și metoda cuprinde în plus administrarea la subiect a unui agent terapeutic suplimentar. În anumite variante de realizare, agentul terapeutic suplimentar este administrat sistemic. În anumite variante de realizare, subiectul are o tumoare solidă și agentul terapeutic suplimentar este un anticorp anti-PD-1. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-PD-1 este pembrolizumab sau

nivolumab. În anumite variante de realizare, pembrolizumabul este administrat într-o doză de 200 mg la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, subiectul are carcinom cu celule scuamoase de cap și gât și agentul terapeutic suplimentar este un anticorp anti-EGFR. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-EGFR este cetuximab. În anumite variante de realizare, subiectul are cancer de sân HER2+ și agentul terapeutic suplimentar este un anticorp anti-HER2. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-HER2 este trastuzumab. În anumite variante de realizare, aceste metode cuprind în plus administrarea unui agent chimioterapeutic la subiect. În anumite variante de realizare, agentul chimioterapeutic este administrat sistemic. În anumite variante de realizare, agentul chimioterapeutic este gemcitabina. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează intratumoral și subiectul are o tumoare solidă avansată sau metastatică. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează intratumoral și subiectul are cancer de cap și gât (de exemplu, carcinom de cap și gât cu celule scuamoase recidivat/refractor). În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează intratumoral și subiectul are cancer de sân (de exemplu, cancer de sân HER2+ recidivat /refractor). În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este livrată la un ganglion limfatic de drenaj tumoral. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este livrată prin administrare localizată (de exemplu, administrare subcutanată). În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este livrată prin intermediul unei administrări localizate (de exemplu, administrare subcutanată) de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, sau 3 mg/kg. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este livrată prin intermediul unei administrări localizate (de exemplu, administrare subcutanată) într-o doză care este cu, de până la de 5-ori, 10-ori, 20-ori, 30-ori, 40-ori, 50-ori, 60-ori, 70-ori, 80-ori, 90-ori, 100-ori, sau 200-ori mai scăzută decât o doză dată prin administrare sistemică. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este livrată prin intermediul unei administrări localizate (de exemplu, administrare subcutanată) într-o doză care este cu, de până la 10-ori mai scăzută decât o doză dată prin administrarea sistemică. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este

livrată prin intermediul unei administrări localizate (de exemplu, administrare subcutanată) într-o doză care este cu de până la 100-ori mai scăzută decât o doză dată prin administrarea sistemică. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este livrată prin intermediul unei administrări localizate (de exemplu, administrare subcutanată) și metoda cuprinde în plus administrarea unui agent terapeutic suplimentar la subiect. În anumite variante de realizare, agentul terapeutic suplimentar este un vaccin. În anumite variante de realizare, vaccinul cuprinde un complex peptidic de proteină de șoc termic (HSPPC) care cuprinde o proteină de șoc termic complexată cu o peptidă antigenică. Într-o variantă de realizare, proteina de șoc termic este proteina gp96 și este complexată cu o peptidă antigenică asociată tumorii, în care HSPPC-ul este derivat dintr-o tumoare obținută de la un subiect. În anumite variante de realizare, proteina de șoc termic este selectată din grupul care constă din hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, gp96, calreticulină, un mutant al acestora și combinații de două sau mai multe dintre acestea. În anumite variante de realizare, proteina de șoc termic este hsc70. În anumite variante de realizare, proteina de șoc termic este hsp70. În anumite variante de realizare, peptida antigenică este sintetică. În anumite variante de realizare, subiectul are cancer. În anumite variante de realizare, subiectul are o boală infecțioasă. În anumite variante de realizare, aceste metode cuprind în plus administrarea unui agent terapeutic suplimentar la subiect. În anumite variante de realizare, agentul terapeutic suplimentar este un agent chimioterapeutic sau un agent de țintire a punctului de control. În anumite variante de realizare, agentul de țintire a punctului de control este selectat din grupul care constă dintr-un anticorp antagonist anti-PD-1, un anticorp antagonist anti-PD-L1, un anticorp antagonist anti-PD-L2, un anticorp antagonist anti-CTLA-4, un anticorp antagonist anti-TIM-3, un anticorp antagonist anti-LAG-3, un anticorp antagonist anti-CEACAM1, un anticorp agonist anti-GITR, un anticorp agonist anti-OX40, și un anticorp agonist anti-CD137, un anticorp agonist anti-DR3, un anticorp agonist anti-TNFSF14, și un anticorp agonist anti-CD27. În anumite variante de realizare, agentul terapeutic suplimentar este radioterapia. În anumite variante de realizare, agentul terapeutic suplimentar este un inhibitor de indoleamin-2,3-dioxigenază (IDO). Inhibitorii de IDO adecvați includ, fără limitare, epacadostat, F001287, indoximod, și NLG919. În anumite variante de realizare, agentul terapeutic suplimentar este un vaccin. În anumite variante de realizare, vaccinul cuprinde un complex peptidic de proteină de șoc termic (HSPPC) care cuprinde o proteină de șoc

termic complexată cu o peptidă antigenică. Într-o variantă de realizare, proteina de șoc termic este proteina gp96 și este complexată cu o peptidă antigenică asociată tumorii, în care HSPPC-ul este derivat dintr-o tumoare obținută de la un subiect.

Este dezvăluită o metodă de tratare a unei boli infecțioase la un subiect, metodă care cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici. Este dezvăluită o metodă de prevenire a unei boli infecțioase la un subiect, metodă care cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici. Prezenta invenție se referă în plus la un anticorp izolat conform invenției, sau la o compoziția farmaceutică conform invenției, pentru utilizarea într-o metodă pentru tratarea unei boli infecțioase la un subiect.

Un anticorp conform prezentei invenții, o polinucleotidă conform invenției, un vector conform invenției și/sau o celulă gazdă recombinantă conform invenției, pot fi utilizate ca medicament.

Un anticorp conform prezentei invenții, o polinucleotidă conform invenției, un vector conform invenției și/sau o celulă gazdă recombinantă conform invenției, pot fi utilizate ca diagnostic.

Un anticorp conform prezentei invenții, o polinucleotidă conform invenției, un vector conform invenției și/sau o celulă gazdă recombinantă conform invenției, pot fi utilizate pentru detectarea *in vitro* a CTLA-4 uman într-o probă biologică.

Într-un aspect, aici este furnizată o compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 descris aici și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic, pentru utilizarea ca medicament.

O compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 descris aici și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic, poate fi utilizată ca diagnostic.

Într-un aspect, este furnizată aici o compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 descris aici, o polinucleotidă conform invenției, un vector conform

invenției și/sau o celulă gazdă recombinată conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic. Compoziția farmaceutică poate fi pentru utilizarea ca un medicament și/sau diagnostic.

Este dezvăluit că un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, este pentru utilizarea într-o metodă pentru creșterea activării celulelor T ca răspuns la un antigen.

Este dezvăluit faptul că un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, este pentru utilizarea într-o metodă de creștere a activării celulelor T ca răspuns la un antigen la un subiect.

Este dezvăluit faptul că un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții este pentru utilizarea într-o metodă pentru creșterea activării celulelor T ca răspuns la un antigen la un subiect, care cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente dintr-un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform invenției.

Un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, poate fi pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului.

Un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, poate fi pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului la un subiect.

Un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, poate fi pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului la un subiect care cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente dintr-un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform invenției.

Este furnizat (a) un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții și (b) un agent terapeutic suplimentar, preferabil un anticorp anti-PD-1, pentru utilizarea ca un medicament.

Este furnizat (a) un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții și (b) un agent terapeutic suplimentar, preferabil un anticorp anti-PD-1, pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului. Cancerul poate fi o tumoare solidă. Anticorpul, polinucleotida, vectorul, celula gazdă recombinantă, și/sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții pot fi administrate intratumoral la subiect, preferabil administrat intratumoral la subiect la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, sau 3 mg/kg, opțional la un interval de o dată la fiecare trei săptămâni.

Este furnizată o compoziție farmaceutică, un kit sau un kit de piese care cuprinde (a) un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții și (b) un agent terapeutic suplimentar, preferabil un anticorp anti-PD-1.

Este furnizat (a) un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții și (b) un anticorp anti-EGFR, și opțional (c) un agent chimioterapeutic, pentru utilizarea ca un medicament.

Este furnizat (a) un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții și (b) un anticorp anti-EGFR, și opțional (c) un agent chimioterapeutic, pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului. Cancerul poate fi carcinom cu celule scuamoase de cap și gât. Anticorpul, polinucleotida, vectorul, celula gazdă recombinantă, și/sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții pot fi administrate intratumoral la subiect, preferabil administrat intratumoral la subiect la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, sau 3 mg/kg, opțional la un interval de o dată la fiecare trei săptămâni.

Este furnizat o compoziție farmaceutică, kit sau kit de piese care cuprinde (a) un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție

farmaceutică conform prezentei invenții și (b) un anticorp anti-EGFR, și opțional (c) un agent chimioterapeutic.

Este furnizat (a) un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții și (b) un anticorp anti-HER2, și opțional (c) un agent chimioterapeutic, pentru utilizarea ca un medicament.

Este furnizat (a) un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții și (b) un anticorp anti-HER2, și opțional (c) un agent chimioterapeutic, pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului de sân HER2+. Anticorpul, polinucleotida, vectorul, celula gazdă recombinantă, și/sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții pot fi administrate intratumoral la subiect, preferabil administrate intratumoral la subiect la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, sau 3 mg/kg, opțional la un interval de o dată la fiecare trei săptămâni.

Este furnizată o compoziție farmaceutică, kit sau kit de piese care cuprinde (a) un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții și (b) un anticorp anti-HER2, și opțional (c) un agent chimioterapeutic.

Un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, pot fi pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului, în care anticorpul, polinucleotida, vectorul, celula gazdă recombinantă, și/sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții pot fi administrate intratumoral la subiect, preferabil administrate intratumoral la subiect la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, sau 3 mg/kg, opțional la un interval de o dată la fiecare trei săptămâni.

Un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, poate fi pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului, în care anticorpul, polinucleotida, vectorul, celula gazdă recombinantă, și/sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții sunt administrate subcutanat sau intravenos la subiect, preferabil administrate

intravenos la subiect la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, sau 10 mg/kg, opțional la un interval de o dată la fiecare trei săptămâni.

Este furnizat (a) un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții și (b) un agent terapeutic suplimentar, pentru utilizarea ca un medicament. Agentul terapeutic suplimentar poate fi un agent chimioterapeutic sau un agent de țintire a punctului de control sau un inhibitor de indoleamin-2,3-dioxigenază (IDO) sau un vaccin.

Este furnizat (a) un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții și (b) un agent terapeutic suplimentar, pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului. Agentul terapeutic suplimentar poate fi un agent chimioterapeutic sau un agent de țintire a punctului de control sau un inhibitor de indoleamin-2,3-dioxigenază (IDO) sau un vaccin.

Este furnizată o compoziție farmaceutică, kit sau kit de piese care cuprinde (a) un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții și (b) un agent terapeutic suplimentar. Agentul terapeutic suplimentar poate fi un agent chimioterapeutic sau un agent de țintire a punctului de control sau un inhibitor de indoleamin-2,3-dioxigenază (IDO) sau un vaccin.

Un anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, pot fi pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului, și/sau pentru utilizarea într-o metodă pentru creșterea activării celulelor T ca răspuns la un antigen, în care anticorpul, polinucleotida, vectorul, celula gazdă recombinantă, și/sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții este livrată la un ganglion limfatic de drenaj tumoral.

Este dezvăluită utilizarea unui anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții într-o metodă pentru tratamentul cancerului, și/sau într-o metodă pentru creșterea activării celulelor

T ca răspuns la un antigen la un subiect, în care anticorpul, polinucleotida, vectorul, celula gazdă recombinantă, și/sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții este livrată la un ganglion limfatic de drenaj tumoral.

Este dezvăluită utilizarea unui anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, pentru prepararea de medicamente pentru imunoterapie, de exemplu, pentru creșterea activării celulelor T ca răspuns la un antigen la un subiect, tratarea cancerului, sau tratarea sau prevenirea bolilor infecțioase.

Este dezvăluită utilizarea unui anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, pentru prepararea de medicamente pentru imunoterapie, de exemplu, pentru creșterea activării celulelor T ca răspuns la un antigen la un subiect, tratarea cancerului, sau tratarea sau prevenirea bolilor infecțioase, în care anticorpul, polinucleotida, vectorul, celula gazdă recombinantă, și/sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții este livrată la un ganglion limfatic de drenaj tumoral.

Este dezvăluită utilizarea (a) unui anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții și (b) unui anticorp anti-HER2, și opțional (c) unui agent chimioterapeutic, pentru prepararea unui medicament pentru imunoterapie, de exemplu, pentru creșterea activării celulelor T ca răspuns la un antigen la un subiect, tratarea cancerului, sau tratarea sau prevenirea bolilor infecțioase.

Este dezvăluită utilizarea (a) unui anticorp, polinucleotidă, vector, celulă gazdă recombinantă, și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții și (b) unui anticorp anti-HER2, și opțional (c) unui agent chimioterapeutic, pentru prepararea unui medicament pentru imunoterapie, de exemplu, pentru creșterea activării celulelor T ca răspuns la un antigen la un subiect, tratarea cancerului, sau tratarea sau prevenirea bolilor infecțioase, în care anticorpul, polinucleotida, vectorul, celula gazdă recombinantă, și/sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții este livrată la un ganglion limfatic de drenaj tumoral.

4. SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Figurile 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, și 1G sunt histograme de citometrie în flux care prezintă legarea anticorpilor anti-CTLA-4 sau a unui izotip IgG₁ de anticorp martor la celulele Jurkat modificate prin inginerie pentru a exprima CTLA-4 uman pe suprafața celulei. Anticorpilor anti-CTLA-4 testați sunt: AGEN1884.H1.1 (IgG₁), AGEN1884.H1.2 (IgG₁), AGEN1884.H1.3 (IgG₁), AGEN1884.H2.1 (IgG₁), AGEN1884.H2.2 (IgG₁), AGEN1884.H2.3 (IgG₁), și AGEN1884.H3 (IgG₁).

Figura 2 este un grafic care arată producția de IL-2 de către PBMC-urile umane primare după incubarea sub stimulare sub-optimală cu superantigen de enterotoxină stafilococică A (SEA) în absența sau prezența anticorpului anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁) sau a unui izotip de anticorp martor (IgG₁). Au fost efectuate replicări de opt pentru fiecare grup, și valorile medii ale celor opt replicări sunt indicate cu o bară neagră.

Figura 3 este un grafic care arată rezultatele unui test raportor de IL-2-luciferază care demonstrează că blocarea CTLA-4 conduce la activarea celulelor T. Multiplicitatea răspunsului exprimării luciferazei, un marker surrogat pentru activarea genei IL-2, este reprezentat grafic într-un interval de concentrații de anticorpi pentru AGEN1884.H3 (IgG₁) sau a unui izotip de anticorp martor (IgG₁).

Figura 4 este un grafic care prezintă rezultatele unui test raportor în care angajarea simultană a AGEN1884.H3 (IgG₁) pentru a ținti celulele (*prin intermediu* legării CTLA-4) și a celulelor efectoare (*prin intermediu* legării FcγRIIIA) declanșează exprimarea luciferazei de către linia de celule efectoare. Activitatea luciferazei este un marker surrogat pentru semnalizarea FcγRIIIA. Multiplicitatea răspunsului a valorilor RLU este reprezentat grafic în raport cu un interval de concentrații de anticorpi pentru AGEN1884.H3 (IgG₁) și ale unui izotip de anticorp martor (IgG₁).

Figurile 5A, 5B, 5C, și 5D sunt histograme de citometrie în flux care prezintă celule Jurkat care exprimă CTLA-4 incubat cu anticorpul anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁), AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/I332E), AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E), sau AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/I332E).

L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L), sau un anticorp martor de izotip. Legarea anticorpilor a fost detectată utilizând un anticorp secundar conjugat cu fluorocrom.

Figurile 6A și 6B sunt grafice care prezintă blocarea legării dintre CTLA-4 uman și liganzii săi, CD80 și respectiv CD86, de către AGEN1884.H3 (IgG_i S239D/A330L/I332E). Celulele Jurkat modificate prin inginerie pentru a exprima constitutiv CTLA-4 uman au fost incubate cu anticorp anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁-S239D/A330E/I332E), un anticorp de referință anti-CTLA-4 sau un izotip de anticorp martor (IgG₁), și apoi colorate cu ligandul etichetat fluorescent indicat. Legarea ligandului a fost apoi evaluată prin citometrie în flux.

Figurile 7A, 7B, și 7C sunt grafice care prezintă producția de IL-2 de PBMC-uri umane primare cultivate sub stimulare sub-optimală cu superantigenul SEA în absența sau prezența unui anticorp martor de izotip (IgG₁) sau a unui anticorp anti-CTLA-4. Figurile 7A și 7B sunt grafice care prezintă producția de IL-2 stimulată fie de o singură doză, fie de titrarea dozei de izotip de anticorp martor (IgG₁) sau anticorpilor anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁), AGEN1884.H3 (IgG_i S239D/I332E), AGEN1884.H3 (IgG_i S239D/A330L/I332E), și AGEN1884.H3 (IgG_i L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L). În studiul prezentat în Figura 7B, în plus față de anticorpul martor de izotip (IgG₁) sau anticorpul anti-CTLA-4, celulele din fiecare probă au fost, de asemenea, incubate cu un izotip de anticorp martor IgG₄ S228P. Figura 7C este un grafic care arată producția de IL-2 stimulată printr-o titrare a dozei a unui izotip de anticorp martor (IgG₁) sau a anticorpilor anti-CTLA-4 AGEN1884 (IgG₁), AGEN1884 (IgG_i S239D/I332E), AGEN1884 (IgG_i S239D/A330L/I332E), și AGEN1884 afucozilat (IgG₁). **Figura 8A** este o analiză imunoblot pentru ZAP70 fosforilat (Y493) în PBMC-uri umane după stimularea cu 50 ng/ml de superantigen SEA și 10 μg/ml de izotip de anticorp martor (IgG₁) sau anticorpi anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁), AGEN1884.H3 (IgG_i S239D/A330L/I332E), sau AGEN1884.H3 (IgG₁ N297A). **Figura 8B** este o diagramă care prezintă analiza densitometrică normalizată a datelor prezentate în Figura 8A.

Figurile 9A, 9B, 9C, și 9D sunt grafice care prezintă eficacitatea antitumorală și epuizarea celulelor T reglatoare intratumorale (Treg) indusă de variantele Fc ale anticorpului murin anti-CTLA-4 9D9. Figura 9A prezintă creșterea tumorii la șoarecii CT26 în urma tratamentului cu doză unică cu anticorp murin anti-CTLA-

4 9D9 (mIgG2a), o variantă Fc-silențioasă a anticorpului anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A), o variantă de Fc a anticorpului anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E), sau un izotip de anticorp martor (mIgG2a). Panoul superior arată volumul median al tumorii în timp pentru fiecare grup de tratament. Panourile rămase arată volumul tumorii în timp pentru animalele individuale din fiecare grup de tratament. Figura 9B prezintă efectul tratamentului cu anticorp anti-CTLA-4 asupra populațiilor de celule T din infiltrate tumorale colectate de la șoareci tratați cu doze unice de anticorp anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a), anticorp anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A), anticorp anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E), sau izotip de anticorp martor (mIgG2a). Infiltratele tumorale au fost recoltate și analizate prin citometrie în flux la momentele de timp indicate după injectarea cu anticorp. Populațiile de celule analizate includ: FoxP3⁺ Treg (panoul din stânga sus), leucocite CD45⁺ (panoul din dreapta sus) și CD4⁺ non-Treg (panoul din stânga jos). Panoul din dreapta jos prezintă raportul dintre celulele T CD8⁺ și Treg-urile observate în infiltratele tumorale. Figura 9C prezintă populațiile FoxP3⁺ Treg de-a lungul timpului în ganglionii limfatici care drenează tumorile recoltați de la șoareci tratați așa cum este descris pentru Figura 9B. Figura 9D prezintă multiplicitatea modificării în Treg-uri FoxP3⁺ splenice la 72 de ore după tratament, așa cum este descris pentru Figura 9B.

Figura 10 prezintă o serie de grafice care ilustrează eficacitatea antitumorală a anticorpilor anti-CTLA-4 murini atunci când sunt combinați cu vaccinul tumoral derivat dintr-o tumoare HPV⁺ (antigeni virali E6/E7). Sunt prezentate volumele tumorilor în timp pentru șoarecii individuali care nu au primit niciun tratament, izotip de anticorp martor (mIgG2a), anticorp anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a), sau o variantă de Fc a unui anticorp anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E). Graficele din rândul de sus arată rezultate pentru animalele cărora li s-a administrat numai tratamentul cu anticorpul indicat. Graficele din rândul de jos arată rezultatele pentru animalele cărora li s-a administrat tratamentul cu anticorpul indicat în combinație cu vaccinul tumoral.

Figurile 11A și 11B sunt grafice care arată exprimarea genelor și metilarea CpG a populațiilor de celule T umane. Celule T nereglatoare CD4⁺ CD25^{+/-} FOXP3⁻ (Teff) și celule T reglatoare CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ (Treg) au fost izolate din sânge periferic de la donatori sănătoși, extinse și activate. Figura 11A

prezintă nivelurile de FOXP3, CTLA-4 intracelular și CTLA-4 membranar în fiecare populație de celule T activate, așa cum este determinat prin citometrie în flux. Figura 11B arată nivelul de metilare CpG în regiunile CpG din *FOXP3* (panoul de sus) și *CTLA4* (panoul de jos) loci în celule T naive, celulele T efectoare activate și celulele T reglatoare activate, fiecare de la același donator. **Figurile 12A și 12B** sunt grafice care arată cursurile în timp ale citotoxicității celulare dependente de anticorp (ADCC) ale celulelor țintă CTLA-4+ umane după incubarea cu anticorpul anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁) sau variante Fc ale acestora. Celule NK-92 (exprimând FcγRIIIA V158) au fost co-cultivate cu celule țintă CTLA-4+ care au fost incubate cu diferite variante de Fc ale anticorpilor anti-CTLA-4 sau cu un izotip martor IgG₁ (10 μg/ml). Microscopia de conținut ridicat a activării 3/7 a caspazei a fost utilizată apoi pentru a se cuantifica activitatea ADCC. Figura 12A prezintă activitatea ADCC în celule Jurkat modificate prin inginerie pentru a exprima CTLA-4 pe suprafața celulei, atunci când sunt incubate cu AGEN1884.H3 (IgG₁), AGEN1884.H3 (IgGi N297A), AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), AGEN1884.H3 (IgGi S267E/L328F), AGEN1884.H3 afucozilat (IgG₁), sau un izotip de anticorp martor (IgG₁). Figura 12B prezintă activitatea ADCC în celule T efectoare activate umane primare (panoul din stânga) sau celule T reglatoare (panoul din dreapta) atunci când sunt incubate cu acești anticorpi.

Figurile 13A, 13B, 13C, și 13D sunt grafice care prezintă efectele variantelor de anticorpi anti-CTLA-4 asupra funcției celulelor T atunci când sunt administrate singure sau în combinație cu un anticorp anti-PD-1. PBMC-urile umane au fost izolate de la doi donatori și incubate în condiții de cultură stimulative cu anticorp anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁), o variantă de Fc de anticorp anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau un izotip de anticorp martor (IgG₁), în combinație cu un anticorp de referință anti-PD-1 sau un izotip de anticorp martor (IgG₄), după cum este indicat. Pentru fiecare stare de tratament listată, a fost utilizată o titrare a dozei pentru primul anticorp listat și a fost utilizată o concentrație fixă (5 μg/ml) pentru al doilea anticorp listat. Acest experiment a fost efectuat de două ori, pentru un total de două replicări per donator. Nivelurile producției de IL-2 induse de fiecare combinație de anticorpi pe PBMC-uri colectate de la primul donator sunt prezentate în Figura 13A (replicatul 1) și Figura 13B (replicatul 2). Nivelurile producției de IL-2 induse

de fiecare combinație de anticorpi pe PBMC-urile colectate de la al doilea donator sunt prezentate în Figura 13C (replicatul 1) și Figura 13D (replicatul 2). **Figurile 14A, 14B, și 14C** sunt o serie de alinieri de secvențe. Figura 14A este o aliniere a secvenței de CTLA-4 uman (SECV ID NR: 33), CTLA-4 de maimuță cynomolgus (SECV ID NR: 40), CTLA-4 de șoarece (SECV ID NR: 41), și CTLA-4 de șobolan (SECV ID NR: 42). Punctele reprezintă resturi identice cu resturile umane corespunzătoare. Un "*" (asterisc) indică pozițiile care au un singur rest complet conservat. A ":" (două puncte) indică conservarea între grupuri cu proprietăți puternic similare. A "." (punct) indică conservarea între grupuri cu proprietăți slab similare. Figurile 14B și 14C sunt alinieri de secvențe pentru CTLA-4 uman (resturile 1-144 și resturile 145-223 ale SECV ID NR: 33, respectiv), maimuță cynomolgus CTLA-4 (resturile 1-144 și resturile 145-223 ale SECV ID NR: 40, respectiv), CD28 uman (resturile 1-127 și resturile 128-220 ale SECV ID NR: 43, respectiv), ICOS uman (resturile 1-124 și resturile 125-199 ale SECV ID NR: 44, respectiv), BTLA uman (resturile 1-125 și resturile 126-289 ale SECV ID NR: 45, respectiv), și PD-1 uman (resturile 1-143 și resturile 144-288 ale SECV ID NR: 46, respectiv). Cele două regiuni care prezintă o scădere puternică a absorbției de deuteriu atunci când CTLA-4 uman a fost legat de AGEN1884-Fab sunt subliniate în figurile 14A-14C: resturile 80-82 (QVT, SECV ID NR: 39) și resturile 135-149 (YPPPYLGLGNGTQI, SECV ID NR: 37), numerotate conform SECV ID NR: 33.

5. DESCRIEREA DETALIATĂ

Prezenta dezvăluire furnizează anticorpi care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și antagonizează funcția CTLA-4, *de exemplu*, suprimarea imună mediată de CTLA-4. De asemenea, sunt furnizate compoziții farmaceutice care cuprind acești anticorpi, acizi nucleici care codifică acești anticorpi, vectori de exprimare și celule gazdă pentru producerea acestor anticorpi și anticorpi și compoziții farmaceutice pentru utilizarea în metode de tratare a cancerului sau a unei boli infecțioase la un subiect. Anticorpilor descriși aici sunt deosebit de utili pentru creșterea activării celulelor T ca răspuns la un antigen (*de exemplu*, un antigen tumoral sau un antigen de boală infecțioasă) și, prin urmare, pentru tratarea cancerului la un

subiect sau tratarea sau prevenirea unei boli infecțioase la un subiect. Toate cazurile de "anticorpi izolați" descrise aici sunt avute în vedere suplimentar ca anticorpi care pot fi, dar nu trebuie să fie, izolați. Toate cazurile de "polinucleotide izolate" descrise aici sunt avute în vedere suplimentar ca polinucleotide care pot fi, dar nu trebuie să fie, izolate. Toate cazurile de "anticorpi" descrise aici sunt avute în vedere suplimentar ca anticorpi care pot fi, dar nu trebuie să fie, izolați. Toate cazurile de "polinucleotide" descrise aici sunt avute în vedere suplimentar ca polinucleotide care pot fi, dar nu trebuie să fie, izolate.

Persoana de specialitate va aprecia că un rest de aminoacid glutamat (E) sau glutamină (Q) la capătul N-terminal al unei regiuni variabile a lanțului greu și/sau unei regiuni variabile a lanțului ușor a oricăruia dintre anticorpii descriși aici (de exemplu, un anticorp anti-CTLA4) se poate converti, în anumite condiții, spontan în piroglutamat prin ciclizarea post-translațională a grupării amino libere pentru a forma o lactamă. În consecință, în anumite variante de realizare ale fiecăreia dintre metodele, utilizările, compozițiile farmaceutice sau kiturile descrise aici, restul de aminoacid N-terminal al uneia sau mai multor regiuni variabile ale lanțului greu și/sau regiuni variabile ale lanțului ușor ale anticorpului are a fost convertit în piroglutamat (de exemplu, ca rezultat al ciclizării post-translaționale a grupării amino libere a restului E sau Q N-terminal).

5.1 Definiții

Așa cum sunt utilizați aici, termenii "aproximativ" și "cu aproximație", atunci când sunt utilizați pentru a modifica o valoare numerică sau un interval numeric, indică faptul că abaterile peste 5% la 10% (*de exemplu*, până la peste 5% la 10%) și sub 5% la 10% (*de exemplu*, până la sub 5% la 10%) valoarea sau intervalul rămân în sensul dorit al valorii sau intervalului menționat.

Așa cum se utilizează aici, termenul "CTLA-4" se referă la proteina 4 asociată limfocitelor T citotoxice. Așa cum se utilizează aici, termenul "CTLA-4 uman" se referă la o proteină CTLA-4 umană codificată de o genă de CTLA-4 uman de tip sălbatic, *de exemplu*, GenBank™ număr de acces NM_005214.4 sau NM_001037631.2. O

secvență de aminoacizi imatură exemplificativă a CTLA-4 uman este furnizată ca SECV ID NR: 33.

Așa cum se utilizează aici, termenii "anticorp" și "anticorpi" includ anticorpi cu lungime completă, fragmente de legare la antigen ale anticorpilor cu lungime completă și molecule care cuprind CDR-uri, regiuni VH sau regiuni VL de anticorp. Exemple de anticorpi includ anticorpi monoclonali, anticorpi produși recombinant, anticorpi monospecifici, anticorpi multispecifici (inclusiv anticorpi bispecifici), anticorpi umani, anticorpi umanizați, anticorpi himerici, imunoglobuline, anticorpi sintetici, anticorpi tetramerici care cuprind două molecule de lanț greu și două de lanț ușor, un anticorp monomer cu lanț ușor, un anticorp monomer cu lanț greu, un anticorp dimer cu lanț ușor, un anticorp dimer cu lanț greu, o pereche un anticorp cu lanț ușor - anticorp cu lanț greu, intracorpi, anticorpi heteroconjugați, conjugați anticorp-medicament, anticorpi cu un singur domeniu, anticorpi monovalenți, anticorpi cu un singur lanț sau Fv-uri cu un singur lanț (scFv), anticorpi camelizați, aficorpi, fragmente de Fab, fragmente de $F(ab')_2$, Fv-uri legate prin disulfură (sdFv), anticorpi anti-idiotipici (anti-Id) (incluzând, *de exemplu*, anticorpi anti-anti-Id), și fragmente de legare la antigen a oricăruia dintre cei de mai sus. În anumite variante de realizare, anticorpul descriși aici se referă la populații de anticorpi policlonali. Anticorpul pot fi de orice tip (*de exemplu*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA sau IgY), orice clasă (*de exemplu*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ sau IgA₂), sau orice subclasă (*de exemplu*, IgG_{2a} sau IgG_{2b}) ale moleculei de imunoglobulină. În anumite variante de realizare, anticorpul descriși aici sunt anticorpi IgG, sau o clasă (*de exemplu*, IgG₁ sau IgG₄ uman) sau subclasă a acestora. Într-o variantă de realizare specifică, anticorpul este un anticorp monoclonal umanizat. Într-o altă variantă de realizare specifică, anticorpul este un anticorp monoclonal uman.

Așa cum se utilizează aici, termenii "regiune VH " și "regiune VL " se referă la regiuni variabile ale lanțului greu și, respectiv, ușor de anticorp unic, care cuprinde FR (Regiuni Cadru) 1, 2, 3 și 4 și CDR (Regiuni de determinare a complementarității) 1, 2 și 3 (a se vedea Kabat și colab., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (Publicație NIH Nr. 91-3242, Bethesda)).

Așa cum se utilizează aici, termenul "CDR" sau "regiune de determinare a complementarității" înseamnă situsurile necontigue de combinare a antigenului găsite

în regiunea variabilă a polipeptidelor cu lanț greu și ușor. Aceste regiuni specifice au fost descrise de Kabat și colab., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) și Kabat și colab., Sequences of protein of immunological interest. (1991), de Chothia și colab., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), și de MacCallum și colab., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), unde definițiile includ suprapunerea sau subseturi de resturi de aminoacizi la compararea unuia cu celălalt. În anumite variante de realizare, termenul "CDR" este un CDR așa cum este definit de Kabat și colab., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) și Kabat și colab., Sequences of protein of immunological interest. (1991). În anumite variante de realizare, termenul "CDR" este un CDR așa cum este definit de Chothia și colab., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987). În anumite variante de realizare, termenul "CDR" este un CDR așa cum este definit de MacCallum și colab., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) și Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," în Antibody Engineering, ed. Kontermann și Dübel, capitolul 31, pag. 422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001).

Așa cum se utilizează aici, termenul "resturi de aminoacizi de cadru (FR)" se referă la acei aminoacizi din regiunea de cadru a unui lanț de imunoglobulină. Termenul "regiune de cadru" sau "regiune FR" așa cum se utilizează aici, include resturile de aminoacizi care fac parte din regiunea variabilă, dar nu fac parte din CDR-uri (*de exemplu*, folosind definiția Kabat sau Chothia a CDR-urilor).

Așa cum se utilizează aici, termenii "regiune variabilă" și "domeniu variabil" sunt utilizați interschimbabil și sunt uzuali în domeniu. Regiunea variabilă se referă în mod tipic la o porțiune a unui anticorp, în general, o porțiune a unui lanț ușor sau greu, în mod tipic de aproximativ 110 la 125 aminoacizi în lanțul greu matur și aproximativ 90 la 115 aminoacizi în lanțul ușor matur, care diferă extensiv ca secvență între anticorpi și sunt utilizate în legarea și specificitatea unui anumit anticorp pentru antigenul său particular. Variabilitatea secvenței este concentrată în acele regiuni denumite regiuni de determinare a complementarității (CDR-uri), în timp ce regiunile cu o conservare mai mare din domeniul variabil sunt denumite regiuni cadru (FR). Fără a dori să fim legați de vreun mecanism sau teorie particulară, se crede că CDR-urile lanțurilor ușor și greu sunt în principal responsabile pentru interacțiunea și specificitatea anticorpului cu antigenul. În anumite variante de realizare, regiunea variabilă este o regiune variabilă umană. În anumite variante de realizare, regiunea

variabilă cuprinde CDR-uri de rozătoare sau murine și regiuni cadru umane (FR-uri). În variante de realizare particulare, regiunea variabilă este o regiune variabilă de primată (de exemplu, primată non-umană). În anumite variante de realizare, regiunea variabilă cuprinde CDR-uri de rozătoare sau murine și regiuni cadru (FR-uri) de primat (de exemplu, primat non-uman).

Termenii "VL" și "domeniu VL" sunt utilizați interschimbabil pentru a se referi la regiunea variabilă a lanțului ușor a unui anticorp.

Termenii "VH" și "domeniu VH" sunt utilizați interschimbabil pentru a se referi la regiunea variabilă a lanțului greu a unui anticorp.

Așa cum se utilizează aici, termenii "regiune constantă" și "domeniu constant" sunt interschimbabili și sunt uzuali în domeniu. Regiunea constantă este o porțiune de anticorp, *de exemplu*, o porțiune carboxil terminală a unui lanț ușor și/sau greu care nu este direct implicată în legarea unui anticorp la antigen, dar care poate prezenta diferite funcții efectoare, cum ar fi interacțiunea cu un receptor de Fc (*de exemplu*, receptor gamma de Fc). Regiunea constantă a unei molecule de imunoglobulină are în general o secvență de aminoacizi mai conservată în raport cu un domeniu variabil de imunoglobulină.

Așa cum se utilizează aici, termenul "lanț greu" atunci când este utilizat cu referire la un anticorp se poate referi la orice tip distinct, *de exemplu*, alfa (α), delta (δ), epsilon (ϵ), gamma (γ), și mu (μ), pe baza secvenței de aminoacizi a domeniului constant, care dă naștere la clasele de anticorpi IgA, IgD, IgE, IgG și, respectiv IgM, inclusiv subclasele de IgG, de exemplu, IgG₁, IgG₂, IgG₃, și IgG₄.

Așa cum se utilizează aici, termenul "lanț ușor" când este utilizat cu referire la un anticorp se poate referi la orice tip distinct, *de exemplu*, kappa (κ) sau lambda (λ) pe baza secvenței de aminoacizi a domeniilor constante. Secvențele de aminoacizi de lanț ușor sunt bine cunoscute în domeniu.

Așa cum se utilizează aici, termenul "sistem de numerotare EU" se referă la convenția de numerotare EU pentru regiunile constante ale unui anticorp, așa cum

este descrisă în Edelman, G.M. și colab., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) și Kabat și colab., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health and Human Services, ediția a-5-a, 1991.

"Afinitate de legare" se referă în general la puterea sumei totale a interacțiunilor necovalente între un singur situs de legare al unei molecule (*de exemplu*, un anticorp) și partenerul său de legare (*de exemplu*, un antigen). Cu excepția cazului în care este indicat altfel, așa cum se utilizează aici, "afinitate de legare" se referă la afinitatea de legare intrinsecă care reflectă o interacțiune 1:1 între membrii unei perechi de legare (*de exemplu*, anticorp și antigen). Afinitatea unei molecule X pentru partenerul său Y poate fi reprezentată în general prin constanta de disociere (K_D). Afinitatea poate fi măsurată și/sau exprimată într-o serie de modalități cunoscute în domeniu, incluzând, dar fără a se limita la, constanta de disociere de echilibru (K_D), și constanta de asociere de echilibru (K_A). K_D se calculează din câtul $k_{\text{oprit}}/k_{\text{pornit}}$, în timp ce K_A se calculează din câtul $k_{\text{pornit}}/k_{\text{oprit}}$. k_{pornit} se referă la constanta vitezei de asociere a, *de exemplu*, unui anticorp la un antigen, și k_{oprit} se referă la constanta vitezei de disociere a, *de exemplu*, unui anticorp la un antigen. Valorile lui k_{pornit} și k_{oprit} pot fi determinate prin tehnici cunoscute unui specialist în domeniu, cum ar fi BIAcore® sau KinExA. Așa cum se utilizează aici, o "afinitate mai mică" se referă la un K_D mai mare.

Așa cum se utilizează aici, termenii "se leagă în mod specific", "recunoaște specific", "se leagă imunospecific" și "recunoaște imunospecific" sunt termeni analogi în contextul anticorpilor și se referă la molecule care se leagă la un antigen (*de exemplu*, epitop sau complex imun) așa cum o astfel de legare este înțeleasă de un specialist în domeniu. De exemplu, o moleculă care se leagă în mod specific la un antigen se poate lega la alte peptide sau polipeptide, în general cu afinitate mai mică, așa cum este determinată de, *de exemplu*, prin imunoteste, BIAcore®, instrument KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID), sau alte teste cunoscute în domeniu. Într-o variantă de realizare specifică, moleculele care se leagă în mod specific la un antigen se leagă la antigen cu o K_A care este de cel puțin 2 log (*adică*, factori de 10), 2,5 log, 3 log, 4 log sau mai mare decât K_A când moleculele se leagă nespecific la un alt antigen.

Într-o altă variantă de realizare specifică, moleculele care se leagă în mod

specific la un antigen nu reacționează încrucișat cu alte proteine în condiții de legare similare. Într-o altă variantă de realizare specifică, moleculele care se leagă în mod specific la CTLA-4 nu reacționează încrucișat cu alte proteine non-CTLA-4. Într-o variantă de realizare specifică, este furnizat aici un anticorp care se leagă la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) cu o afinitate mai mare decât pentru un alt antigen neînrudit. În anumite variante de realizare, este furnizat aici un anticorp care se leagă la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) cu o afinitate de legare de 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% sau mai ridicată decât la un alt antigen, neînrudit, măsurată prin, *de exemplu*, un radioimunotest, rezonanță plasmonică de suprafață sau un test de excludere cinetică. Într-o variantă de realizare specifică, gradul de legare a unui anticorp anti-CTLA-4 descris aici la o proteină non-CTLA-4 neînrudită este mai mic de 10%, 15% sau 20% din legarea anticorpului la o proteină CTLA-4 măsurată prin, *de exemplu*, un radioimunotest.

Așa cum se utilizează aici, termenul "afucozilare" sau "afucozilat" în contextul unui Fc se referă la o lipsă substanțială a unei fucoze atașate covalent, direct sau indirect, la restul 297 al regiunii Fc de IgG₁ umană, numerotate conform sistemului de numerotare EU, sau restul corespunzător din imunoglobuline non-IgG₁ sau IgG₁ non-umane. Astfel, într-o compoziție care cuprinde o multitudine de anticorpi afucozilați, cel puțin 70% dintre anticorpi nu vor fi fucozilați, direct sau indirect (*de exemplu*, prin intermediul zaharurilor intermediare) la restul 297 al regiunii Fc a anticorpilor, și în unele variante de realizare cel puțin 80%, 85%, 90%, 95% sau 99% nu vor fi fucozilați, direct sau indirect, la restul 297 al regiunii Fc.

Așa cum se utilizează aici, un "epitop" este un termen în domeniu și se referă la o regiune localizată a unui antigen la care se poate lega specific un anticorp. Un epitop poate fi, *de exemplu*, aminoacizi contigui ai unei polipeptide (epitop liniar sau contiguu) sau un epitop poate, *de exemplu*, să se formeze din două sau mai multe regiuni necontigue împreună ale unei polipeptide sau polipeptide (epitop conformațional, neliniar, discontinuu sau necontiguu). În anumite variante de realizare, epitopul la care se leagă un anticorp poate fi determinat prin, *de exemplu*, spectroscopie RMN, studii de cristalografie cu difracție de raze X, teste ELISA, schimb de hidrogen/deuteriu cuplat cu spectrometrie de masă (*de exemplu*, spectrometrie de

masă cu electropulverizare prin cromatografie lichidă), teste de scanare de oligopeptide pe bază de matrice (*de exemplu*, constrângerea peptidelor folosind CLIPS (Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds) pentru a cartografia epitopii discontinui sau conformaționali) și/sau cartografierea mutagenezei (*de exemplu*, cartografierea mutagenezei dirijate la situs). Pentru cristalografia cu raze X, cristalizarea poate fi realizată folosind oricare dintre metodele cunoscute în domeniu (*de exemplu*, Giegé R și colab., (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). Cristalele de anticorp:antigen pot fi studiate utilizând tehnici bine cunoscute de difracție cu raze X și pot fi rafinate utilizând un software de calculator cum ar fi X-PLOR (Yale University, 1992, distribuit de Molecular Simulations, Inc.; a se vedea, *de exemplu*, *Meth Enzymol* (1985) volumele 114 & 115, editori Wyckoff HW și colab.,; U.S. 2004/0014194), și 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 și colab., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Studiile de cartografiere a mutagenezei pot fi realizate folosind orice metodă cunoscută unui specialist în domeniu. A se vedea, *de exemplu*, Champe M și colab., (1995) *J Biol Chem* 270: 1388-1394 și Cunningham BC & Wells JA (1989) *Science* 244: 1081-1085, pentru o descriere a tehnicilor de mutageneză, inclusiv tehnicile de mutageneză cu scanare a alaninei. CLIPS (Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds) este o tehnologie de prezentare a uneia sau mai multor peptide într-o configurație constrânsă structural pentru a se comporta ca imitații funcționale ale domeniilor proteice complexe. A se vedea, *de exemplu*, Publicațiile U.S. nr. US 2008/0139407 A1 și US 2007/099240 A1, și Brevetul US Nr. 7,972,993. Într-o variantă de realizare specifică, epitopul unui anticorp este determinat utilizând studii de mutageneză cu scanare de alanină. Într-o variantă de realizare specifică, epitopul unui anticorp este determinat utilizând schimbul de hidrogen/deuteriu cuplat cu spectrometrie de masă. Într-o variantă de realizare specifică, epitopul unui anticorp este determinat utilizând tehnologia CLIPS Epitope Mapping de la Pepscan Therapeutics.

Așa cum se utilizează aici, termenul "un epitop localizat într-o regiune a CTLA-4 uman" care constă dintr-o anumită secvență de aminoacizi sau un set de resturi de aminoacizi se referă la un epitop care cuprinde unul sau mai multe dintre resturile de

aminoacizi ale regiunii specificate, în care regiunea specificată include primul rest de aminoacid specificat și ultimul rest de aminoacid specificat al regiunii de CTLA-4 uman. În anumite variante de realizare, epitopul cuprinde fiecare dintre resturile de aminoacizi situate în regiunea specificată. În anumite variante de realizare, respectivul unul sau mai multe resturi de aminoacizi suplimentare ale CTLA-4 uman din afara regiunii specificate se leagă la un anticorp împreună cu un epitop situat în regiunea specificată.

Așa cum se utilizează aici, termenii "receptor de celule T" și "TCR" sunt utilizați interschimbabil și se referă la TCR-uri $\alpha\beta$ sau $\gamma\delta$ heterodimerice cu lungime completă, fragmente de legare la antigen ale TCR-uri cu lungime completă și molecule care cuprind CDR-uri sau regiuni variabile de TCR. Exemple de TCR-uri includ, dar nu sunt limitate la, TCR-uri cu lungime completă, fragmente de legare la antigen ale TCR-urilor cu lungime completă, TCR-uri solubile lipsite de regiuni transmembranare și citoplasmice, TCR-uri cu un singur lanț care conțin regiuni variabile ale unor TCR-uri atașate printr-un linker flexibil, lanțuri de TCR legate printr-o legătură disulfurică modificată prin inginerie, TCR-uri monospecifice, TCR-uri multispecifice (inclusiv TCR-uri bispecifice), fuziuni de TCR, TCR-uri umane, TCR-uri umanizate, TCR-uri himerice, TCR-uri produse recombinant și TCR-uri sintetice. Termenul cuprinde TCR-uri de tip sălbatic și TCR-uri modificate genetic (*de exemplu*, un TCR himeric care cuprinde un lanț de TCR himeric care include o primă porțiune dintr-un TCR al unei prime specii și o a doua porțiune dintr-un TCR al unei a doua specii).

Așa cum se utilizează aici, termenii "complex de histocompatibilitate major " și "MHC" sunt utilizați interschimbabil și se referă la o moleculă de MHC clasa I și/sau o moleculă de MHC clasa II.

Așa cum se utilizează aici, termenul "complex peptidă-MHC" se referă la o moleculă de MHC (MHC clasa I sau MHC clasa II) cu o peptidă legată în buzunarul de legare a peptidei recunoscut în domeniu al MHC.

Așa cum se utilizează aici, termenul "trata", "tratare" și "tratament" se referă la măsurile terapeutice sau preventive descrise aici. Metodele de "tratament" folosesc administrarea unui anticorp la un subiect care are o boală sau tulburare, sau este predispus la o astfel de boală sau tulburare, pentru a preveni, vindeca, întârzia, reduce

severitatea sau ameliora unul sau mai multe simptome ale bolii sau tulburării sau a bolii sau tulburării recurente, sau pentru a prelungi supraviețuirea unui subiect peste cea așteptată în absența unui astfel de tratament.

Așa cum se utilizează aici, termenul "cantitate eficientă" în contextul administrării unei terapii la un subiect se referă la cantitatea unei terapii care realizează un efect profilactic sau terapeutic dorit.

Așa cum se utilizează aici cu privire la răspunsul unui cancer la o terapie, termenii "refractor" și "rezistent" au semnificația lor recunoscută în domeniu și sunt utilizați interschimbabil.

Așa cum se utilizează aici, termenul "subiect" include orice animal uman sau non-uman. Într-o variantă de realizare, subiectul este un mamifer uman sau non-uman. Într-o variantă de realizare, subiectul este un om.

Determinarea "identității procentuale" între două secvențe (*de exemplu*, secvențe de aminoacizi sau secvențe de acid nucleic) pot fi realizate folosind un algoritm matematic. Un exemplu specific, nelimitativ de algoritm matematic utilizat pentru compararea a două secvențe este algoritmul lui Karlin S & Altschul SF (1990) PNAS 87: 2264-2268, modificat ca în Karlin S & Altschul SF (1993) PNAS 90: 5873-5877. Un astfel de algoritm este încorporat în programele NBLAST și XBLAST ale lui Altschul SF și colab., (1990) J Mol Biol 215: 403. Căutările de nucleotide BLAST pot fi efectuate cu parametrii setați ai programului de nucleotide NBLAST, *de exemplu*, pentru scor=100, lungime a cuvântului=12 pentru a obține secvențe de nucleotide omoloage cu o moleculă de acid nucleic descrisă aici. Căutările de proteine BLAST pot fi efectuate cu parametrii setați ai programului XBLAST, *de exemplu*, pentru scor 50, lungimea cuvântului = 3 pentru a se obține secvențe de aminoacizi omoloage cu o moleculă de proteină descrisă aici. Pentru a se obține alinieri cu goluri în scopuri de comparație, Gapped BLAST poate fi utilizat așa cum este descris în Altschul SF și colab., (1997) Nuc Acids Res 25: 3389-3402. Alternativ, PSI BLAST poate fi folosit pentru a se efectua o căutare iterativă care detectează relații îndepărtate între molecule (*Id.*). Când se utilizează programele BLAST, Gapped BLAST și PSI Blast, pot fi utilizați parametrii implicați ai programelor respective (*de exemplu*, ai XBLAST și

NBLAST) (*a se vedea, de exemplu*, National Center for Biotechnology Information (NCBI) pe web în întreaga lume, ncbi.nlm.nih.gov). Un alt exemplu specific, nelimitativ de algoritm matematic utilizat pentru compararea secvențelor este algoritmul lui Myers și Miller, 1988, CABIOS 4:11-17. Un astfel de algoritm este încorporat în programul ALIGN (versiunea 2.0) care face parte din pachetul de software de aliniere a secvenței GCG. Când se utilizează programul ALIGN pentru compararea secvențelor de aminoacizi, se poate utiliza un tabel de resturi de greutate PAM120, o penalizare pentru lungimea golului de 12 și o penalizare a golului de 4.

Identitatea procentuală dintre două secvențe poate fi determinată folosind tehnici similare celor descrise mai sus, cu sau fără goluri permise. La calcularea identității procentuale, sunt numărate tipic numai potrivirile exacte.

5.2 Anticorpi anti-CTLA-4

Într-un aspect, prezenta dezvăluire furnizează anticorpi care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și antagonizează funcția lui CTLA-4. Secvențele de aminoacizi ale anticorpilor exemplari sunt prezentate în Tabelele 1-4 de aici.

Tabelul 1. Secvențele de aminoacizi ale anticorpilor anti-CTLA-4 exemplificativi.*

SEC NR:	ID	Descriere	Secvență de aminoacizi
1		AGEN1884 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGL MGFDIWGQGTMTVTVSS
2		AGEN1884_M102F VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTMTVTVSS
3		AGEN1884_M113L VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGL MGFDIWGQGTMTVTVSS
4		AGEN1884 D62E VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGL MGFDIWGQGTMTVTVSS
5		AGEN1884_M102F_M113L VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTMTVTVSS
6		AGEN1884_D62E_M102F VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTMTVTVSS
7		AGEN1884_D62E_M113L VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGL MGFDIWGQGTMTVTVSS

SECV ID NR:	Descriere	Secvență de aminoacizi
8	AGEN1884_D62E_M102 F_M113L VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSSSSYIYYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTLVTVSS
9	AGEN1884 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLGW YQQKPGQAPRLIYGASTRATGIPDRFSGSGGTD FTLTITRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVE IK
10	CDRH1	SYSMN
11	CDRH2	SISSSSYIYYADSVKG
12	CDRH2	SISSSSYIYYAESVKG
13	CDRH3	VGLMGPFDI
14	CDRH3	VGLFGPFDI
15	CDRL1	RASQSVSRYL
16	CDRL2	GASTRAT
17	CDRL3	QQYGSSPWT
18	CDRH2 secvență consensus	SISSSSYIYYAXSVKG, în care: X este E sau D
19	CDRH3 secvență consensus	VGLXGPFDI, în care: X este ForM

SECV NR:	ID	Descriere	Secvență de aminoacizi
20		VH secvență consensus	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYAX₁SVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGL X₂GPFDIWGQGT₃VTVSS, în care: X₁ este E sau D, X₂ este F sau M, și X₃ este L sau M.
23		AGEN1884.H3 (IgG1) lanț greu	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGT₁VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNV₁FSCSVMEALHNHYTQKSLSLS PG

SECV NR:	ID	Descriere	Secvență de aminoacizi
24		AGEN1884.H3 (IgG ₁ S239D/I332E) lanț greu	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPD VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPEEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKSLS LSPG
25		AGEN1884.H3 (IgG ₁ S239D/A330L/I332E) lanț greu	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPD VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPEEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHREALHNHYTQKSLS LSPG

SECV NR:	ID	Descriere	Secvență de aminoacizi
26		AGEN1884.H3 (IgG1 00L/P396L) lanț greu	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELVGGPS VFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTLRVVSFLT VLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS LSPG
47		AGEN1884.H3 (IgG1 N297A) lanț greu	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVPEKSCDKTHTCPPCPAPELVGGPSV FLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTLRVVSFLT VLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLT VTKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS PG

SECV NR:	ID	Descriere	Secvență de aminoacizi
48		AGEN1884.H3 (IgG1 S267E/L328F) lanț greu	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVEHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYCKVSNKAFPAPIEKTIKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS PG
27		AGEN1884.H3 lanț ușor	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRYLGW YQQKPGQAPRLIYGASTRATGIPDRFSGSGGTD FTLTITRLEPEDFAVYCYQQYGSSPWTFGGGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
28		IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSC DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCK VSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SECV NR:	ID	Descriere	Secvență de aminoacizi
29		IgG1 S239D/I332E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPE PVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELGGPDVFLPPKPKDITLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPEEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30		IgG1 S239D/A330L/I332E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPE PVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELGGPDVFLPPKPKDITLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPLPEEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31		IgG1 L235V/F243L/R292P/Y3 00L/P396L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPE PVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELVGGPSVFLPPKPKDITLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTLRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

SECV NR:	ID	Descriere	Secvență de aminoacizi
32		Regiune constantă a lanțului ușor	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
* CDR-urile sunt definite conform sistemului de numerotare Kabat.			

Tabelul 2. Secvențele de aminoacizi ale lanțului greu al CDR-urilor unor anticorpi anti-CTLA-4 exemplificativi.*

VH (SECV ID NR:)	CDRH1 (SECV ID NR:)	CDRH2 (SECV ID NR:)	CDRH3 (SECV ID NR:)
AGEN1884 VH (1)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSV KG (11)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_M102F VH (2)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSV KG (11)	VGLFGPFDI (14)
AGEN1884 _M113L VH (3)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSV KG (11)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884 D62E VH (4)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESV KG (12)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_M102F_M113 L VH(5)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSV KG (11)	VGLFGPFDI (14)
AGEN1884_D62E_M102F VH (6)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESV KG (12)	VGLFGPFDI (14)
AGEN1884_D62E_M113L VH (7)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESV KG (12)	VGLMGPFDI (13)

VH (SECV ID NR:)	CDRH1 (SECV ID NR:)	CDRH2 (SECV ID NR:)	CDRH3 (SECV ID NR:)
AGEN1884_D62E_M102F M113L VH (8)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESV KG (12)	VGLFGPFDI (14)
*Definite conform sistemului de numerotare Kabat.			

Tabelul 3. Secvențele de aminoacizi ale lanțului ușor al CDR-urilor unor anticorpi anti-CTLA-4 exemplificativi.*

VL (SECV ID NR:)	CDRL1 (SECV ID NR:)	CDRL2 (SECV ID NR:)	CDRL3 (SECV ID NR:)
AGEN1884 VL (9)	RASQSVSRYLG (15)	GASTRAT (16)	QQYGSSPWT (17)
*Definite conform sistemului de numerotare Kabat.			

Tabelul 4. Anticorpi anti-CTLA-4 exemplificativi.

Anticorp	Regiune variabilă a lanțului greu	SECV ID NR:	Regiune variabilă a lanțului ușor	SECV ID NR:
AGEN1884	AGEN1884 VH	1	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H1.1	AGEN1884_M102F VH	2	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H1.2	AGEN1884_M113L VH	3	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H1.3	AGEN1884_D62E VH	4	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H2.1	AGEN1884_M102F_M113L VH	5	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H2.2	AGEN1884_D62E_M102F VH	6	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H2.3	AGEN1884_D62E_M113L VH	7	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H3	AGEN1884_D62E_M102F_M113L VH	8	AGEN1884 VL	9

Tabelul 5. Cele mai apropiate gene ale liniei germinale.

SECV ID NR:	Cea mai apropiată genă a liniei germinale	Secvență de aminoacizi
21	IGHV3-21*01	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVK GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R
22	IGKV3-20*01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYGSSP

Tabelul 6. Secvențe exemplificative ale CTLA-4 și membrilor familiei.

SECV ID NR:	Descriere	Secvență de aminoacizi
33	Proteină imatură de CTLA-4 uman (P16410)	MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFLLFIPVFC KAMHVAQPAVVLASSRGIAFVCEYASPGKATEV RVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP PPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWLAAVSS GLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPP TEPECEKQFQPYFIPIN
34	Epitop de CTLA-4	YLG I
35	Epitop de CTLA-4	YPPPY YLG I
36	Epitop de CTLA-4	YLGIGNGTQ I
37	Epitop de CTLA-4	YPPPY YLGIGNGTQ I
38	Epitop de CTLA-4	MYPPPY Y
39	Epitop de CTLA-4	QVT

SECV ID NR:	Descriere	Secvență de aminoacizi
40	MACFA CTLA-4 (G7PL88)	MACLGFQRHKARLNLATRTRPYTLLFSLLFIPVFS KAMHVAQPAVVLANSRGIA SFVCEYASPGKATE VRVTVL RQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDS ICTGTSSGNQVNLT IQGLRAMDTGLYICKVELMY PPPYMGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILA AVS SGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMP PTEPECEKQFPYFIPIN
41	CTLA-4 de șoarece (P09793)	MACLGLRRYKAQLQLPSRTWP FVALLTLLFIPVFS EAIQVTQPSVVLASSHG VASFPCEYSPSHNTDEV R VTVL RQTNDQMTEVCATTFTEKNTVGFLDYPFCS GTFNESRVNLT IQGLRAVD TGLYLCKVELMYPPP YFVG MGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILVAVSLG LFFYSFLVSAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPT EPECEKQFPYFIPIN
42	CTLA-4 de șobolan (Q62859)	MACLGLQRYKTHLQLPSRTWPFGVLLSLLFIPIFSE AIQVTQPSVVLASSHG VASFPCEYASSHNTDEV R VTVL RQTNDQVTEVCATTF TVKNLTGLD DPFCS GTFNESRVNLT IQGLRAAD TGLYFCKVELMYPPP YFVG MGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILA AVSSG LFFYSFLVTA VSLNRTLKKRSPLTTGVYVKMPPT PECEKQFPYFIPIN
43	CD28 uman (P10747)	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDN AVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVV YGNYSQQLQVYSKTGFNC DGKLGNESVTFYLQN LYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK GKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGLACYSLLV TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRK HYOPYAPPRDFAAYRS

SECV ID NR:	Descriere	Secvență de aminoacizi
44	ICOS uman (Q9Y6W8)	MK SGLWYFFLFCLRIK VLTGEINGSANYEMFIFHN GGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGGQILCDLTKTK GSGNTVSIKSLKFCHS QLSNNSVSFFLYNLDHSHA NYYFCNLSIFDPPPFK VTLTGGYLHIYESQLCCQL KFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVH DPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL
45	BTLA uman (Q7Z6A9)	MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNHKGESC DVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHV TWCKLNGTTCVKLED RQTSWKEEKNISFFILHFEP VLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLTYTDVKS A SERPSKDEMASRPWLLYRLLPLGGLPLLITTCFCL FCCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQT EASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEV YSNPCLEENKPGIVYASLNH SVIGPNSRLARNVKE APTEYASICVRS
46	PD-1 uman (Q15116)	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWF LDSPDRPW NPPTFSPALLVVTEGD NATFTCSFSNTSESVLNW YRMSPSNQTDKLA AFPEDRSQPGQDCRFRVTQLP NGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIK ESLRAELRV TERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV VGVVGGLLGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARR TGQPLKEDPSAVPVFSVDY GELDFQWREKTPEPP VPCVPEQTEYATIVFSPSGMGTSSPARRGSADGPRS AQPLRPEDGHCSWPL

Este dezvăluit un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (de exemplu, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând un domeniu de VH care cuprinde una, două, sau toate cele trei CDR-uri ale unui domeniu de VH specificat în Tabelul 1 de aici. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde CDRH1-ul unuia dintre domeniile VH specificate în Tabelul 1. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde CDRH2-ul unuia dintre domeniile VH specificate în Tabelul 1. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde CDRH3-ul unuia dintre domeniile VH specificate în Tabelul 1.

Într-o anumită dezvoltare, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând un domeniu VL care cuprinde una, două sau toate cele trei dintre CDR-urile unui domeniu VL dezvoltat în Tabelul 1 de aici. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde CDRL1-ul unuia dintre domeniile VL specificate în Tabelul 1. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde CDRL2-ul unuia dintre domeniile VL specificate în Tabelul 1. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde CDRL3-ul unuia dintre domeniile VL specificate în Tabelul 1.

Într-o anumită dezvoltare, CDR-urile unui anticorp pot fi determinate conform cu Kabat și colab., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) și Kabat și colab., Sequences of protein of immunological interest (1991).

Într-o anumită dezvoltare, CDR-urile unui anticorp pot fi determinate conform schemei de numerotare Chothia, care se referă la locația buclilor structurale de imunoglobulină (*a se vedea, de exemplu*, Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B și colab., (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C și colab., (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A și colab., (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; și Brevetul U.S. nr. 7,709,226). Tipic, când se utilizează convenția de numerotare Kabat, bucla Chothia CDRH1 este prezentă la aminoacizii 26 la 32, 33 sau 34 ai lanțului greu, bucla Chothia CDRH2 este prezentă la aminoacizii 52 la 56 ai lanțului greu și bucla Chothia CDRH3 este prezentă la aminoacizii 95 la 102 ai lanțului greu, în timp ce bucla Chothia CDRL1 este prezentă la aminoacizii 24 la 34 ai lanțului ușor, bucla Chothia CDRL2 este prezentă la aminoacizii 50 la 56 ai lanțului ușor și bucla Chothia CDRL3 este prezentă la aminoacizii 89 la 97 ai lanțului ușor. Sfârșitul buclei Chothia CDRH1 atunci când este numerotată folosind convenția de numerotare Kabat variază între H32 și H34 în funcție de lungimea buclei (acest lucru se datorează faptului că schema de numerotare Kabat plasează inserțiile la H35A și H35B; dacă nici 35A, nici 35B nu sunt prezente, bucla se termină la 32; dacă este prezent numai 35A, bucla se termină la 33; dacă sunt prezente atât 35A cât și 35B, bucla se termină la 34).

Într-o anumită dezvoltare, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând

CDR-urile de VH Chothia ale unui VH dezvăluite în Tabelul 1 de aici. Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând CDR-urile de VL Chothia ale unui VL dezvăluit în Tabelul 1 de aici. Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând CDR-urile de VH Chothia și CDR-urile de VL Chothia ale unui anticorp dezvăluit în Tabelul 1 de aici. Într-o anumită dezvăluire, anticorpi care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) cuprind una sau mai multe CDR-uri, în care CDR-urile Chothia și Kabat au aceeași secvență de aminoacizi. Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și cuprinde combinații de CDR-uri Kabat și CDR-uri Chothia.

Într-o anumită dezvăluire, CDR-urile unui anticorp pot fi determinate conform sistemului de numerotare IMGT așa cum este descris în Lefranc M-P, (1999) *The Immunologist* 7: 132-136 și Lefranc M-P și colab., (1999) *Nucleic Acids Res* 27: 209-212.

Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează anticorpi care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și cuprind CDR-uri ale unui anticorp dezvăluit în Tabelul 1 de aici, așa cum este determinat de sistemul de numerotare IMGT, de exemplu, așa cum este descris în Lefranc M-P (1999) *supra* și Lefranc M-P și colab., (1999) *supra*.

Într-o anumită dezvăluire, CDR-urile unui anticorp pot fi determinate conform schemei de numerotare AbM, care se referă la regiuni hipervariabile AbM, care reprezintă un compromis între CDR-urile Kabat și buclele structurale Chothia și sunt utilizate de software-ul de modelare a anticorpilor AbM de la Oxford Molecular (Oxford Molecular Group, Inc.). Într-o variantă de realizare particulară, prezenta dezvăluire furnizează anticorpi care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și cuprind CDR-uri ale unui anticorp dezvăluit în Tabelul 1 de aici așa cum este determinat de schema de numerotare AbM.

Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care

se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), în care anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde secvențele de aminoacizi ale regiunilor CDRH1, CDRH2, și CDRH3 ale unui domeniu VH specificate în SECV ID NR: 2, 4, 5, 6, 7, sau 8, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde secvențele de aminoacizi ale regiunilor CDRL1, CDRL2, și CDRL3 ale unui domeniu VL specificate în SECV ID NR: 9, în care fiecare CDR este definit în conformitate cu definiția MacCallum, definiția Kabat, definiția Chothia, combinația dintre definiția Kabat și definiția Chothia, sistemul de numerotare IMGT sau definiția AbM a CDR.

Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând:

- (a) un CDRH1 care cuprinde secvența de aminoacizi a SYSMN (SECV ID NR: 10); și/sau
- (b) un CDRH2 care cuprinde secvența de aminoacizi a SSSSSSYIYYAXSVKG (SECV ID NR: 18), în care X este E sau D; și/sau
- (c) un CDRH3 care cuprinde secvența de aminoacizi a VGLXGPFDI (SECV ID NR: 19), în care X este F sau M; și/sau
- (d) CDRL1 cuprinde secvența de aminoacizi a RASQSVSRYL (SECV ID NR: 15); și/sau
- (e) CDRL2 cuprinde secvența de aminoacizi a GASTRAT (SECV ID NR: 16); și/sau
- (f) CDRL3 cuprinde secvența de aminoacizi a QQYGSSPWT (SECV ID NR: 17), și în care secvențele de CDRH1, CDRH2, și CDRH3 ale anticorpului nu sunt SECV ID NR: 10, 11, și respectiv 13.

Într-o anumită dezvăluire, CDRH2 cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 11. Într-o anumită dezvăluire, CDRH2 cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 12. Într-o anumită dezvăluire, CDRH3 cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 13. Într-o anumită dezvăluire, CDRH3 cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 14.

Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), în care anticorpul cuprinde un domeniu VH care cuprinde secvențele de aminoacizi ale CDRH1, CDRH2, și CDRH3 specificate în SECV ID NR: 10, 11, și 14; 10, 12, și 13; sau 10, 12, și respectiv 14. Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), în care anticorpul cuprinde un domeniu VH care cuprinde secvențele de aminoacizi ale CDRH1, CDRH2, și CDRH3 specificate în SECV ID NR: 10, 12, și respectiv 14.

Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), în care anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde regiunile CDRH1, CDRH2, și CDRH3, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde regiunile CDRL1, CDRL2, și CDRL3, în care regiunile CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, și CDRL3 cuprind secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 10, 11, 14, 15, 16, și 17; 10, 12, 13, 15, 16, și 17; sau 10, 12, 14, 15, 16, și respectiv 17. Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), în care anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde regiunile CDRH1, CDRH2, și CDRH3, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde regiunile CDRL1, CDRL2, și CDRL3, în care regiunile CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, și CDRL3 cuprind secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 10, 12, 14, 15, 16, și respectiv 17.

Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi a SECV ID NR: 20. Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi care este de cel puțin 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, sau 100% (*de exemplu*, cel puțin 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 sau 99%) identică cu secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 2, 4, 5, 6, 7, sau 8. Într-o anumită dezvăluire, prezenta

dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi care este de cel puțin 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, sau 100% (*de exemplu*, cel puțin 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 sau 99%) identică cu secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 3. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 2, 4, 5, 6, 7, sau 8. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 2. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 3. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 4. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 5. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 6. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 7. Anticorpul conform invenției cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 8.

Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), care cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi care este cel puțin 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, sau 100% (*de exemplu*, cel puțin 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 sau 99%) identică cu secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 9. Anticorpul conform invenției cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor având secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 9.

Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi a SECV ID NR: 20, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi a SECV ID NR: 9. Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), care

cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi care este de cel puțin 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, sau 100% (*de exemplu*, cel puțin 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 sau 99%) identică cu secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 2, 4, 5, 6, 7, sau 8, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi care este de cel puțin 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, sau 100% (*de exemplu*, cel puțin 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 sau 99%) identică cu secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 9. Într-o anumită dezvoltare, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi care este de cel puțin 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, sau 100% (*de exemplu*, cel puțin 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 sau 99%) identică cu secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 3, și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde o secvență de aminoacizi care este de cel puțin 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, sau 100% (*de exemplu*, cel puțin 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 sau 99%) identică cu secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 9. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune variabilă a lanțului ușor având secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 2 și 9; 4 și 9; 5 și 9; 6 și 9; 7 și 9; sau 8 și respectiv 9. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune variabilă a lanțului ușor având secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 2 și respectiv 9. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune variabilă a lanțului ușor având secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 3 și respectiv 9. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune variabilă a lanțului ușor având secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 4 și respectiv 9. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune variabilă a lanțului ușor având secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 5 și respectiv 9. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune variabilă a lanțului ușor având secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 6 și respectiv 9. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune variabilă a lanțului ușor având secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 7 și respectiv 9. Anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu și o regiune variabilă

a lanțului ușor având secvențele de aminoacizi specificate în SECV ID NR: 8 și respectiv 9.

Este dezvăluit un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu având o secvență de aminoacizi derivată de la o secvență a liniei germinal de IGHV3-21 uman (*de exemplu*, IGHV3-21 *01, *de exemplu*, având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 21). Una sau mai multe regiuni selectate dintre cadrul 1, cadrul 2, cadrul 3, CDRH1, și CDRH2 (*de exemplu*, două, trei, patru sau cinci dintre aceste regiuni) pot fi derivate dintr-o secvență a liniei germinale de IGHV3-21 umane (*de exemplu*, IGHV3-21*01, *de exemplu*, având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 21). Într-o variantă de realizare, cadrul 1, cadrul 2, cadrul 3, CDRH1, și CDRH2 sunt toate derivate de la o secvență a liniei germinale de IGHV3-21 uman (*de exemplu*, IGHV3-21 *01, *de exemplu*, având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 21).

Este dezvăluit un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), care cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor având o secvență de aminoacizi derivată de la o secvență a liniei germinale umane selectată din grupul care constă din IGKV3-20 (*de exemplu*, IGKV3-20*01, *de exemplu*, având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 22). Una sau mai multe regiuni selectate dintre cadrul 1, cadrul 2, cadrul 3, CDRL1, și CDRL2 (*de exemplu*, două, trei, patru sau cinci dintre aceste regiuni) pot fi derivate de la o secvență a liniei germinale umane selectată din grupul care constă din IGKV3-20 (*de exemplu*, IGKV3-20*01, *de exemplu*, având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 22). Într-o variantă de realizare, cadrul 1, cadrul 2, cadrul 3, CDRL1, și CDRL2 sunt toate derivate de la o secvență a liniei germinale umane selectată din grupul care constă din IGKV3-20 (*de exemplu*, IGKV3-20*01, *de exemplu*, având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 22).

Este dezvăluit un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu având o secvență de aminoacizi derivată de la o secvență a liniei germinale de IGHV3-21 uman (*de exemplu*, IGHV3-21 *01, *de exemplu*, având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 21), și o regiune variabilă a lanțului ușor având o secvență de aminoacizi derivată de la o secvență a liniei germinale umane selectată din grupul care constă din IGKV3-

20 (*de exemplu*, IGKV3-20*01, *de exemplu*, având secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 22).

Este dezvăluit un anticorp izolat care concurează încrucișat pentru legarea la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) cu un anticorp care cuprinde secvențele de aminoacizi din regiunea variabilă a lanțului greu și ușor specificate în SECV ID NR: 2 și 9; 4 și 9; 5 și 9; 6 și 9; 7 și 9; sau 8 și respectiv 9. În anumite variante de realizare, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care concurează încrucișat pentru legarea la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) cu un anticorp care cuprinde secvențele de aminoacizi ale regiunii variabile a lanțului greu și ușor specificate în SECV ID NR: 3 și respectiv 9.

Este dezvăluit un anticorp izolat care se leagă de același epitop sau de un epitop suprapus al CTLA-4 (*de exemplu*, un epitop al CTLA-4 uman) ca un anticorp descris aici, *de exemplu*, un anticorp care cuprinde secvențele de aminoacizi ale regiunii variabile a lanțului greu și ușor specificate în SECV ID NR: 2 și 9; 4 și 9; 5 și 9; 6 și 9; 7 și 9; sau 8 și respectiv 9. Este dezvăluit un anticorp izolat care se leagă la același epitop sau unul suprapus al CTLA-4 (*de exemplu*, un epitop al CTLA-4 uman) ca un anticorp descris aici, *de exemplu*, un anticorp care cuprinde secvențele de aminoacizi ale regiunii variabile a lanțului greu și ușor specificate în SECV ID NR: 3 și respectiv 9. Epitopul unui anticorp poate fi determinat prin, *de exemplu*, spectroscopie RMN, rezonanță a plasmonului de suprafață (BIAcore®), studii de cristalografie cu difracție de raze X, teste ELISA, schimb hidrogen/deuteriu cuplat cu spectrometrie de masă (*de exemplu*, spectrometrie de masă cu electropulverizare prin cromatografie lichidă), teste de scanare cu oligo-peptide pe bază de matrice și/sau cartografiere a mutagenezei (*de exemplu*, cartografierea mutagenezei dirijate la situs). Pentru cristalografia cu raze X, cristalizarea poate fi realizată folosind oricare dintre metodele cunoscute în domeniu (*de exemplu*, Giegé R și colab., (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). Cristalele de anticorp:antigen pot fi studiate folosind tehnici bine cunoscute de difracție cu raze X și pot fi rafinate utilizând un software de calculator cum ar fi X-PLOR (Yale University, 1992, distribuit de Molecular Simulations, Inc.; a se vedea, *de exemplu*, Meth Enzymol (1985) volumele 114 & 115, eds Wyckoff HW și colab.; Cererea de

brevet U.S. nr. 2004/0014194), și 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 și colab., (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56(Pt 10): 1316-1323). Studiile de cartografiere a mutagenezei pot fi realizate folosind orice metodă cunoscută unui specialist în domeniu. *A se vedea, de exemplu*, Champe M și colab., (1995) *supra* și Cunningham BC & Wells JA (1989) *supra* pentru o descriere a tehnicilor de mutagenză, inclusiv tehnicile de mutagenză cu scanare de alanină. Într-o variantă de realizare specifică, epitopul unui anticorp este determinat prin utilizarea unor studii de mutagenză cu scanare de alanină. În plus, anticorpii care recunosc și se leagă de aceiași epitopi sau care se suprapun cu CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) pot fi identificați folosind tehnici de rutină, cum ar fi un imunotest, de exemplu, prin arătarea capacității unui anticorp de a bloca legarea altui anticorp la un antigen țintă, *adică*, un test de legare competitivă. Testele de legare competitivă pot fi, de asemenea, utilizate pentru a se determina dacă doi anticorpi au specificitate de legare similară pentru un epitop. Legarea competitivă poate fi determinată printr-un test în care imunoglobulina testată inhibă legarea specifică a unui anticorp de referință la un antigen comun, cum ar fi CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman). Sunt cunoscute numeroase tipuri de teste de legare competitivă, de exemplu: radioimunotest direct sau indirect în fază solidă (RIA), imunotest enzimatic direct sau indirect în fază solidă (EIA), test competitiv sandwich (*a se vedea* Stahli C și colab., (1983) *Methods Enzymol* 9: 242-253); biotină-avidină direct în fază solidă EIA (*a se vedea* Kirkland TN și colab., (1986) *J Immunol* 137: 3614-9); test cu etichetare direct în fază solidă, test sandwich cu etichetare direct în fază solidă (*a se vedea* Harlow E & Lane D, (1988) *Anticorpi: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA cu eticheta directă în fază solidă folosind eticheta I-125 (*a se vedea* Morel GA și colab., (1988) *Mol Immunol* 25(1): 7-15); EIA biotină-avidină direct în fază solidă (*a se vedea* Cheung RC și colab., (1990) *Virology* 176: 546-52); și RIA etichetat direct (*a se vedea* Moldenhauer G și colab., (1990) *Scand J Immunol* 32: 77-82). Tipic, un astfel de test implică utilizarea antigenului purificat (*de exemplu*, CTLA-4 cum ar fi CTLA-4 uman) legat la o suprafață solidă sau celule purtând oricare dintre acestea, o imunoglobulină de testare neetichetată și o imunoglobulină de referință etichetată. Inhibarea competitivă poate fi măsurată prin determinarea cantității de etichetă legată la suprafața solidă sau la celule în prezența imunoglobulinei de testat. Uzual, imunoglobulina de testat este prezentă în exces. Uzual, atunci când un anticorp concurent este prezent în exces,

acesta va inhiba legarea specifică a unui anticorp de referință la un antigen comun cu cel puțin 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% sau mai mult. Un test de legare competitivă poate fi configurat într-un număr mare de formate diferite utilizând fie antigen etichetat, fie anticorp etichetat. Într-o versiune comună a acestui test, antigenul este imobilizat pe o placă cu 96 de godeuri. Capacitatea anticorpilor neetichetați de a bloca legarea anticorpilor etichetați la antigen este apoi măsurată folosind etichete radioactive sau enzimatică. Pentru mai multe detalii a se vedea, de exemplu, Wagener C și colab., (1983) J Immunol 130: 2308-2315; Wagener C și colab., (1984) J Immunol Methods 68: 269-274; Kuroki M și colab., (1990) Cancer Res 50: 4872-4879; Kuroki M și colab., (1992) Immunol Invest 21: 523-538; Kuroki M și colab., (1992) Hybridoma 11: 391-407 și Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow E & Lane D editors supra, pag. 386-389.

Este dezvăluit un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 23, 24, 25, sau 26. Este dezvăluit faptul că anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 23. Este dezvăluit faptul că anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 24. În anumite variante de realizare, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 25. Este dezvăluit faptul că anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 26.

În anumite variante de realizare, anticorpul izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) cuprinde un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi specificată în SECV ID NR: 27.

Este dezvăluit un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 23 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27. Este dezvăluit un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 24 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27. În anumite variante de realizare, anticorpul izolat care

se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 25 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27. Este dezvăluit un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 26 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27.

Este dezvăluit faptul că în anticorpul descriși aici se poate utiliza orice regiune constantă de Ig. Este dezvăluit faptul că regiunea de Ig este o moleculă de imunoglobulină IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, sau IgY umană, orice clasă (*de exemplu*, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, și IgA₂), sau orice subclasă (*de exemplu*, IgG_{2a} și IgG_{2b}) a moleculei de imunoglobulină.

Prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând a o regiune constantă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 28, 29, 30, sau 31. Într-o anumită dezvăluire prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând o regiune constantă a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 32.

Prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG₁, sau fragment al acesteia care cuprinde o mutație selectată din grupul care constă din: S239D, I332E, și o combinație a acestora, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu de IgG₁ care cuprinde mutații S239D și I332E, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 29.

Anticorpul izolat conform invenției care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, care este o regiune constantă de IgG₁ umană, care cuprinde mutații S239D, A330L, și I332E,

numerotate conform sistemului de numerotare EU. În anumite variante de realizare, anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 30.

Este dezvăluit un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), anticorpul cuprinzând o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă a IgG₁, sau fragment al acesteia care cuprinde o mutație selectată din grupul care constă din: L235V, F243L, R292P, Y300L, P396L, și combinații ale acestora, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde o regiune constantă a IgG₁ a lanțului greu care cuprinde mutații L235V, F243L, R292P, Y300L, și P396L, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Într-o anumită dezvoltare, anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 31.

Regiunile de IgG ale anticorpilor descriși aici pot avea o afinitate crescută pentru FcγRIIIA, *de exemplu*, în comparație cu un anticorp cu o regiune Fc de tip sălbatic, *de exemplu*, un Fc de IgG₁. Modificările secvenței care au ca rezultat o afinitate crescută pentru FcγRIIIA sunt cunoscute în domeniu, *de exemplu*, în Kellner și colab., Methods 65: 105-113 (2014), Lazar și colab., Proc Natl Acad Sci 103: 4005-4010 (2006), Shields și colab., J Biol Chem. 276(9):6591-6604 (2001). Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG₁ sau un fragment al acesteia care cuprinde o mutație selectată din grupul care constă din: G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305I, A330L, I332E, E333A, K334A, A339T, și P396L, și combinații ale acestora, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG₁, sau fragment al acesteia care cuprinde S239D, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG₁, sau fragment al acesteia care cuprinde T256A, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG₁, sau fragment al acesteia care cuprinde K290A, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG₁, sau fragment al acesteia care cuprinde S298A, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Anticorpul

poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG1, sau fragment al acesteia care cuprinde I332E, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG1, sau fragment al acesteia care cuprinde E333A, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG1, sau fragment al acesteia care cuprinde K334A, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG1, sau fragment al acesteia care cuprinde A339T, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG1, sau fragment al acesteia care cuprinde S239D și I332E, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Anticorpul cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, care este o regiune constantă de IgG1, care cuprinde S239D, A330L, și I332E, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG1, sau fragment al acesteia care cuprinde S298A, E333A, și K334A, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG1, sau fragment al acesteia care cuprinde G236A, S239D, și I332E, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Anticorpul poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, o regiune constantă de IgG1, sau fragment al acesteia care cuprinde F243L, R292P, Y300L, V305I, și P396L, numerotate conform sistemului de numerotare EU.

Anticorpii descriși aici pot prezenta activitate de citotoxicitate celulară dependentă de anticorp (ADCC). Anticorpii descriși aici pot iniția epuizarea celulară mediată de celule ucigașe naturale. Anticorpii descriși aici pot fi utilizați pentru tratarea tumorii infiltrate cu celule ucigașe naturale. Anticorpii descriși aici pot prezenta activitate de fagocitoză celulară dependentă de anticorp (ADCP). Anticorpii descriși aici pot iniția epuizarea celulară mediată de macrofage. Anticorpii descriși aici pot fi utilizați pentru tratarea tumorii infiltrate cu macrofage. Anticorpii descriși aici pot epuiza selectiv celulele T reglatoare intratumorale.

Anticorpul descris aici poate fi un anticorp activabil care, într-o stare activată,

leagă proteina CTLA-4 umană. Anticorpul activabil poate cuprinde o porțiune de mascare care inhibă legarea anticorpului într-o stare neclivată la proteina CTLA-4 umană și cel puțin un fragment clivabil cuplat la anticorp, de exemplu, în care fragmentul clivabil este o polipeptidă care funcționează ca un substrat pentru o protează care este îmbogățită în micromediul tumoral. Anticorpi activabili exemplificativi sunt descriși, de exemplu, în Brevetele U.S. nr. 8,513,390 și 8,518,404, și Publicațiile cererilor de brevet U.S. nr. US 2014/0255313, US 2014/0010810, US 2014/0023664. Anticorpul activabil poate cuprinde o regiune constantă a lanțului greu de IgG uman, care este o variantă a unei regiuni constante a lanțului greu de IgG uman de tip sălbatic, în care varianta regiunii constante a lanțului greu de IgG uman se leagă de FcγRIIIA uman cu afinitate mai mare decât se leagă o regiune constantă a lanțului greu de IgG uman de tip sălbatic la FcγRIIIA uman.

Una, două sau mai multe mutații (*de exemplu*, substituții de aminoacizi) pot fi introduse în regiunea Fc a unui anticorp descris aici (*de exemplu*, domeniul CH2 (resturile 231-340 de IgG uman₁) și/sau domeniul CH3 (resturile 341-447 de IgG uman₁) și/sau regiunea de balama, numerotată conform sistemului de numerotare EU, pentru a modifica una sau mai multe proprietăți funcționale ale anticorpului, cum ar fi timpul de înjumătățire în ser, fixarea complementului, legarea receptorului de Fc și/sau citotoxicitatea celulară dependentă de antigen.

Una, două sau mai multe mutații (*de exemplu*, substituții de aminoacizi) pot fi introduse în regiunea de balama a regiunii Fc (domeniul CH1) astfel încât numărul de resturi de cisteină din regiunea de balama să fie modificat (*de exemplu*, crescut sau scăzut) așa cum este descris în, *de exemplu*, Brevetul U.S. nr. 5,677,425. Numărul de resturi de cisteină din regiunea de balama a domeniului CH1 poate fi modificat pentru, *de exemplu*, a facilita asamblarea lanțurilor ușoare și grele, sau pentru a modifica (*de exemplu*, crește sau scade) stabilitatea anticorpului.

Una, două sau mai multe mutații de aminoacizi (*de exemplu*, substituții, inserții sau deleții) pot fi introduse într-un domeniu constant al IgG sau într-un fragment de legare la FcRn al acestuia (de preferință un fragment de Fc sau de domeniu de balama al Fc) pentru a modifica (*de exemplu*, scade sau crește) timpul de înjumătățire al anticorpului *in vivo*. A se vedea, *de exemplu*, Publicațiile Internaționale nr. WO

02/060919; WO 98/23289; și WO 97/34631; și Brevetele U.S. nr. 5,869,046, 6,121,022, 6,277,375 și 6,165,745, pentru exemple de mutații care vor modifica (*de exemplu*, scădea sau crește) timpul de înjumătățire al unui anticorp *in vivo*. Una, două sau mai multe mutații de aminoacizi (*de exemplu*, substituții, inserții sau deleții) pot fi introduse într-un domeniu constant de IgG, sau fragment de legare al FcRn al acestuia (preferabil un fragment Fc sau de domeniu de balama de Fc) pentru a descrește timpul de înjumătățire al anticorpului *in vivo*. Una, două sau mai multe mutații de aminoacizi (*de exemplu*, substituții, inserții sau deleții) pot fi introduse într-un domeniu constant de IgG, sau fragment de legare la FcRn al acestuia (preferabil un fragment de Fc sau de domeniu de balama de Fc) pentru a crește timpul de înjumătățire al anticorpului *in vivo*. Anticorpii pot avea una sau mai multe mutații de aminoacizi (*de exemplu*, substituții) în al doilea domeniu constant (CH2) (resturile 231-340 ale IgG₁) uman și/sau al treilea domeniu constant (CH3) (resturile 341-447 ale IgG₁) uman, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Regiunea constantă de IgG₁ a unui anticorp descris aici poate cuprinde o substituție metionină (M) la tirozină (Y) în poziția 252, o substituție serină (S) la treonină (T) în poziția 254, și o substituție treonină (T) la acid glutamic (E) în poziția 256, numerotate conform sistemului de numerotare EU. A se vedea Brevet U.S. nr. 7,658,921. S-a dovedit că acest tip de IgG mutant, denumit "mutant YTE" prezintă un timp de înjumătățire crescut de patru ori în comparație cu versiunile de tip sălbatic ale aceluiași anticorp (*a se vedea* Dall'Acqua WF și colab., (2006) J Biol Chem 281: 23514-24). Un anticorp poate cuprinde un domeniu constant de IgG care cuprinde una, două, trei sau mai multe substituții de aminoacizi ale resturilor de aminoacizi în pozițiile 251-257, 285-290, 308-314, 385-389, și 428-436, numerotate conform sistemului de numerotare EU.

Una, două sau mai multe mutații (*de exemplu*, substituții de aminoacizi) pot fi introduse în regiunea Fc a unui anticorp descris aici (*de exemplu*, domeniu CH2 (resturile 231-340 de IgG₁ uman) și/sau domeniu CH3 (resturile 341-447 de IgG₁ uman) și/sau regiunea de balama, numerotate conform sistemului de numerotare EU, pentru a crește sau a descrește afinitatea anticorpului pentru un receptor de Fc (*de exemplu*, un receptor de Fc activat) pe suprafața unei celule efectoare. Mutații din regiunea Fc a unui anticorp care scad sau cresc afinitatea unui anticorp pentru un receptor de Fc și tehnicile de introducere a unor astfel de mutații în receptorul de Fc sau într-un fragment al acestuia sunt cunoscute specialiștilor în domeniu. Exemple de

mutații ale receptorului de Fc al unui anticorp care pot fi efectuate pentru a modifica afinitatea anticorpului pentru un receptor de Fc sunt descrise în, *de exemplu*, Smith P și colab., (2012) PNAS 109: 6181-6186, Brevet U.S. nr. 6,737,056, și Publicațiile internaționale nr. WO 02/060919; WO 98/23289; și WO 97/34631.

Mai mult, una, două sau mai multe substituții de aminoacizi pot fi introduse într-o regiune Fc a domeniului constant al IgG pentru a modifica funcția(iile) efectoare ale anticorpului. De exemplu, unul sau mai mulți aminoacizi selectați dintre resturile de aminoacizi 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 și 322, numerotate conform sistemului de numerotare EU, pot fi înlocuiți cu un rest de aminoacid diferit, astfel încât anticorpul să aibă o afinitate modificată pentru un ligand efector, dar să păstreze capacitatea de legare a antigenului a anticorpului părinte. Ligandul efector față de care este modificată afinitatea poate fi, de exemplu, un receptor de Fc sau componenta C1 a complementului. Această abordare este descrisă mai detaliat în Brevetele U.S. nr. 5,624,821 și 5,648,260. Deleția sau inactivarea (prin mutații punctuale sau alte mijloace) unui domeniu al regiunii constante poate reduce legarea la receptorul Fc al anticorpului circulant, crescând astfel localizarea tumorii. *A se vedea, de exemplu*, Brevetele U.S. nr. 5,585,097 și 8,591,886, pentru o descriere a mutațiilor care deletează sau inactivează domeniul constant și, prin urmare, cresc localizarea tumorii. Una sau mai multe substituții de aminoacizi pot fi introduse în regiunea Fc a unui anticorp descris aici pentru a îndepărta situsurile potențiale de glicozilare din regiunea Fc, care pot reduce legarea receptorului de Fc (*a se vedea, de exemplu*, Shields RL și colab., (2001) J Biol Chem 276: 6591-604). Pot fi efectuate una sau mai multe dintre următoarele mutații în regiunea constantă a unui anticorp descris aici: o substituție de N297A; o substituție de N297Q; o substituție de L235A și o substituție de L237A; o substituție de L234A și o substituție de L235A; o substituție de E233P; o substituție de L234V; o substituție de L235A; o deleție de C236; o substituție de P238A; o substituție de D265A; o substituție de A327Q; sau o substituție de P329A, numerotate conform sistemului de numerotare EU. O mutație selectată din grupul care constă din D265A, P329A, și o combinație a acestora, numerotate conform sistemului de numerotare EU, poate fi efectuată în regiunea constantă a unui anticorp descris aici.

Un anticorp descris aici poate cuprinde domeniul constant al unei IgG₁ cu o substituție de aminoacizi N297Q sau N297A, numerotate conform sistemului de

numerotare EU. Un anticorp descris aici poate cuprinde domeniul constant al unei IgG₁ cu o mutație selectată din grupul care constă din D265A, P329A, și o combinație a acestora, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Un anticorp descris aici poate cuprinde domeniul constant al unei IgG₁ cu o mutație selectată din grupul care constă din L234A, L235A, și o combinație a acestora, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Resturile de aminoacizi din regiunea constantă a unui anticorp descris aici în pozițiile corespunzătoare pozițiilor L234, L235, și D265 dintr-un lanț greu de IgG₁ umană, numerotate conform sistemului de numerotare EU, pot să nu fie L, L, și respectiv D. Această abordare este descrisă în detaliu în Publicația Internațională nr. WO 14/108483. Aminoacizii corespunzători pozițiilor L234, L235, și D265 dintr-un lanț greu de IgG₁ uman pot fi F, E, și A; sau A, A, și respectiv A, numerotate conform sistemului de numerotare EU.

Unul sau mai mulți aminoacizi selectați dintre resturile de aminoacizi 329, 331 și 322 din regiunea constantă a unui anticorp descris aici, numerotate conform sistemului de numerotare EU, pot fi înlocuiți cu un rest de aminoacid diferit, astfel încât anticorpul să aibă legarea C1q modificată și/sau citotoxicitatea dependentă de complement redusă sau abolită (CDC). Această abordare este descrisă mai detaliat în Brevetul U.S. nr. 6,194,551 (Idusogie și colab.). Unul sau mai multe resturi de aminoacizi din pozițiile de aminoacizi 231 până la 238 din regiunea N-terminală a domeniului CH2 al unui anticorp descris aici pot fi modificate pentru a modifica astfel capacitatea anticorpului de a fixa complementul, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Această abordare este descrisă mai în detaliu în Publicația Internațională nr. WO 94/29351. Regiunea Fc a unui anticorp descris aici poate fi modificată pentru a crește capacitatea anticorpului de a media citotoxicitatea celulară dependentă de anticorp (ADCC) și/sau pentru a crește afinitatea anticorpului pentru un receptor de Fcγ prin mutarea unuia sau mai multor aminoacizi (*de exemplu*, introducând substituții de aminoacizi) în următoarele poziții: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, sau 439, numerotate conform sistemului de numerotare EU. Această abordare este descrisă în continuare în Publicația Internațională nr. WO 00/42072.

Într-o anumită dezvăluire, un anticorp descris aici cuprinde regiunea constantă a unui anticorp IgG₄ și serina de la restul de aminoacid 228 a lanțului greu, numerotate conform sistemului de numerotare EU, este substituită cu prolina.

Oricare dintre mutațiile sau modificările regiunii constante descrise aici poate fi introdusă într-una sau ambele regiuni constante ale lanțului greu ale unui anticorp descris aici având două regiuni constante ale lanțului greu.

Prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și funcționează ca un antagonist.

Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și scade CTLA-4 (*de exemplu*, activitatea CTLA-4 uman) cu cel puțin 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, sau 99% așa cum este analizată prin metode descrise aici și/sau cunoscute de către o persoană de specialitate în domeniu, în raport cu activitatea CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) fără niciun anticorp sau cu un anticorp neînrudit (*de exemplu*, un anticorp care nu se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman))). Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și scade activitatea CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) de cel puțin aproximativ 1,2 ori, 1,3 ori, 1,4 ori, 1,5 ori, 2 ori, 2,5 ori, 3 ori, 3,5 ori, 4 ori, 4,5 ori, 5 ori, 6 ori, 7 ori, 8 ori, 9 ori, 10 ori, 15 ori, 20 ori, 30 ori, 40 ori, 50 ori, 60 ori, 70 ori, 80 ori, 90 ori, sau 100 ori așa cum este analizat prin metodele descrise aici și/sau cunoscute de către o persoană de specialitate în domeniu, în raport cu activitatea CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) activitate fără niciun anticorp sau cu un anticorp neînrudit (*de exemplu*, un anticorp care nu se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman))). Exemple nelimitative de activitate a CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) pot include semnalizarea CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), legarea CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) la un ligand de CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) (*de exemplu*, CD80 sau CD86), și inhibarea producției de citokină (*de exemplu*, IL-2, IFN- γ , sau TNF- α). Într-o anumită dezvăluire, prezenta dezvăluire furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la

CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și dezactivează, reduce, sau inhibă o activitate a CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman). O scădere a activității CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) poate fi evaluată așa cum este descris în Exemple, *infra*.

Într-o dezvoltare specifică, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și reduce legarea CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) la ligandul său (*de exemplu*, CD80 sau CD86) cu cel puțin aproximativ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, sau 99%, așa cum este evaluat prin metode cunoscute de către o persoană de specialitate în domeniu, în raport cu legarea CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) la ligandul său (*de exemplu*, CD80 sau CD86) fără niciun anticorp sau cu un anticorp neînrudit (*de exemplu*, un anticorp care nu se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman)). Într-o dezvoltare specifică, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și reduce legarea CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) la ligandul său (*de exemplu*, CD80 sau CD86) de cel puțin aproximativ 1,2 ori, 1,3 ori, 1,4 ori, 1,5 ori, 2 ori, 2,5 ori, 3 ori, 3,5 ori, 4 ori, 4,5 ori, 5 ori, 6 ori, 7 ori, 8 ori, 9 ori, 10 ori, 15 ori, 20 ori, 30 ori, 40 ori, 50 ori, 60 ori, 70 ori, 80 ori, 90 ori, sau 100 ori, așa cum este evaluat prin metode cunoscute de către o persoană de specialitate în domeniu, în raport cu legarea CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) la ligandul său (*de exemplu*, CD80 sau CD86) fără niciun anticorp sau cu un anticorp neînrudit (*de exemplu*, un anticorp care nu se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman)).

Într-o dezvoltare specifică, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și crește producția de citokină (*de exemplu*, IL-2, IFN- γ , sau TNF- α) cu cel puțin aproximativ 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, sau 99%, așa cum este analizat prin metodele descrise aici (*a se vedea* Exemplele, *infra*) sau cunoscute de către o persoană de specialitate în domeniu, în raport cu producția de citokină fără niciun anticorp sau cu un anticorp neînrudit (*de exemplu*, un anticorp care nu se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman)). Într-o dezvoltare specifică, prezenta dezvoltare furnizează un anticorp izolat care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman)

și crește producția de citokină (*de exemplu*, IL-2, IFN- γ , sau TNF- α) de cel puțin aproximativ 1,2 ori, 1,3 ori, 1,4 ori, 1,5 ori, 2 ori, 2,5 ori, 3 ori, 3,5 ori, 4 ori, 4,5 ori, 5 ori, 6 ori, 7 ori, 8 ori, 9 ori, 10 ori, 15 ori, 20 ori, 30 ori, 40 ori, 50 ori, 60 ori, 70 ori, 80 ori, 90 ori, sau 100 ori, așa cum este analizat prin metodele descrise aici (*a se vedea* exemplele, *infra*) sau cele cunoscute de către o persoană de specialitate în domeniu, în raport cu producția de citokină fără niciun anticorp sau cu un anticorp neînrudit (*de exemplu*, un anticorp care nu se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman)).

Într-o anumită dezvăluire, celulele mononucleare din sânge periferic uman (PBMC-uri) stimulate cu enterotoxina A de stafilococ (SEA) în prezența unui anticorp descris aici, care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), au crescut producția de IL-2 de cel puțin aproximativ 1,2 ori, 1,3 ori, 1,4 ori, 1,5 ori, 2 ori, 2,5 ori, 3 ori, 3,5 ori, 4 ori, 4,5 ori, 5 ori, 6 ori, 7 ori, 8 ori, 9 ori, 10 ori, 15 ori, 20 ori, 30 ori, 40 ori, 50 ori, 60 ori, 70 ori, 80 ori, 90 ori, sau 100 ori în raport cu PBMC-urile stimulate numai cu SEA fără niciun anticorp sau cu un anticorp neînrudit (*de exemplu*, un anticorp care nu se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman)), așa cum este analizat prin metodele descrise aici (*a se vedea* Exemplele, *infra*) sau cunoscute de către o persoană de specialitate în domeniu.

5.3 Compoziții farmaceutice

Sunt furnizate aici compoziții care cuprind un anticorp anti-CTLA-4 descris aici având gradul de puritate dorit într-un purtător, excipient sau stabilizator acceptabil fiziologic (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co, Easton, PA). Purtătorii, excipienții sau stabilizatorii acceptabili sunt netoxici pentru beneficiari la dozele și concentrațiile folosite și includ tamponi cum ar fi fosfat, citrat și alți acizi organici; antioxidanți incluzând acid ascorbic și metionină; conservanți (cum ar fi clorură de octadecildimetilbenzil amoniu; clorură de hexametoni; clorură de benalconiu, clorură de benzetoni; fenol, alcool butilic sau benzilic; alchil parabeni cum ar fi metil sau propil paraben; catecol; rezorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; și m-crezol); polipeptide cu greutate moleculară mică (mai puțin de aproximativ 10 resturi); proteine, cum ar fi albumină serică, gelatină, sau imunoglobuline; polimeri hidrofilici cum ar fi polivinilpirolidonă; aminoacizi cum ar fi glicină, glutamină, asparagină, histidină,

arginină, sau lizină; monozaharide, dizaharide, și alți carbohidrați incluzând glucoză, manoză, sau dextrine; agenți de chelatizare cum ar fi EDTA; zaharuri cum ar fi zaharoză, manitol, trehaloză sau sorbitol; contraioni care formează sare, cum ar fi sodiu; complecși metalici (*de exemplu*, complecși Zn-proteină); și/sau agenți tensioactivi neionici cum ar fi TWEEN™, PLURONICS™ sau polietilenglicol (PEG).

Într-o variantă de realizare specifică, compozițiile farmaceutice cuprind un anticorp anti-CTLA-4 descris aici, și opțional unul sau mai mulți agenți profilactici sau terapeutici suplimentari, într-un purtător acceptabil farmaceutic. Într-o variantă de realizare specifică, compozițiile farmaceutice cuprind o cantitate eficientă dintr-un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia descris aici, și opțional unul sau mai mulți agenți profilactici sau terapeutici suplimentari, într-un purtător acceptabil farmaceutic. În unele variante de realizare, anticorpul este singurul ingredient activ inclus în compoziția farmaceutică. Compozițiile farmaceutice descrise aici pot fi utile în inhibarea activității CTLA-4 și tratarea unei afecțiuni, cum ar fi cancerul sau o boală infecțioasă.

Este furnizată aici o compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient, acceptabil farmaceutic pentru utilizarea ca un medicament.

Într-un aspect, este furnizată aici a compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic, pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului.

Purtătorii acceptabili farmaceutic utilizați în preparatele parenterale includ vehicule apoase, vehicule neapoase, agenți antimicrobieni, agenți izotonici, tampoane, antioxidanți, anestezice locale, agenți de suspendare și dispersare, agenți de emulsionare, agenți de sechestrare sau de chelare și alte substanțe acceptabile farmaceutic. Exemple de vehicule apoase includ clorură de sodiu de injecție, Ringers de injecție, dextroză izotonică de injecție, apă sterilă de injecție, dextroză și lactat Ringers de injecție. Vehiculele parenterale neapoase includ uleiuri fixe de origine vegetală, ulei de semințe de bumbac, ulei de porumb, ulei de susan și ulei de arahide. Agenți antimicrobieni în concentrații bacteriostatice sau fungistatice pot fi adăugați la

preparatele parenterale ambalate în recipiente cu doze multiple care includ fenoli sau crezoli, mercuriali, alcool benzilic, clorobutanol, esteri ai acidului metil și propil p-hidroxibenzoic, timerosal, clorură de benzalconiu și clorură de benzetoniu. Agenții izotonici includ clorura de sodiu și dextroza. Tampoanele includ fosfat și citrat. Antioxidanții includ bisulfat de sodiu. Anestezicele locale includ clorhidrat de procaină. Agenții de suspendare și dispersare includ carboximetilceluloza de sodiu, hidroxipropil metilceluloza și polivinilpirolidona. Agenții de emulsionare includ Polisorbat 80 (TWEEN® 80). Un agent de sechestrare sau de chelatizare a ionilor metalici include EDTA. Purtătorii farmaceutici includ, de asemenea, alcool etilic, polietilen glicol și propilen glicol pentru vehicule miscibile cu apa; și hidroxid de sodiu, acid clorhidric, acid citric sau acid lactic pentru ajustarea pH-ului.

O compoziție farmaceutică poate fi formulată pentru orice cale de administrare la un subiect. Exemple specifice de căi de administrare includ intranazală, orală, pulmonară, transdermică, intradermică și parenterală. Administrarea parenterală, caracterizată fie prin injectare subcutanată, intramusculară fie intravenoasă, este de asemenea avută în vedere aici. Injectabilele pot fi preparate în forme convenționale, fie ca soluții lichide sau suspensii, fie ca forme solide adecvate pentru soluție sau suspensie în lichid înainte de injectare, fie ca emulsii. Injectabilele, soluțiile și emulsiile conțin, de asemenea, unul sau mai mulți excipienți. Excipienții adecvați sunt, de exemplu, apa, soluția salină, dextroza, glicerolul sau etanolul. În plus, dacă se dorește, compozițiile farmaceutice care urmează să fie administrate pot conține, de asemenea, cantități minore de substanțe auxiliare netoxice, cum ar fi agenți de umectare sau de emulsionare, agenți de tamponare a pH-ului, stabilizatori, amelioratori de solubilitate și alți astfel de agenți, cum ar fi, de exemplu, acetat sodiu, monolaurat de sorbitan, oleat de trietanolamină și ciclodextrine.

Preparatele pentru administrarea parenterală a unui anticorp includ soluții sterile gata pentru injectare, produse sterile solubile uscate, cum ar fi pulberile liofilizate, gata pentru a fi combinate cu un solvent chiar înainte de utilizare, inclusiv tablete hipodermice, suspensii sterile gata pentru injectare, produse sterile insolubile uscate gata pentru a fi combinat cu un vehicul chiar înainte de utilizare și emulsii sterile. Soluțiile pot fi fie apoase, fie neapoase.

Dacă sunt administrați intravenos, purtătorii adecvați includ soluție salină fiziologică sau soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) și soluții care conțin agenți de îngroșare și solubilizare, cum ar fi glucoză, polietilen glicol și polipropilen glicol și amestecuri ale acestora.

Amestecuri topice care cuprind un anticorp sunt preparate așa cum este descris pentru administrarea locală și sistemică. Amestecul rezultat poate fi o soluție, suspensie, emulsii sau altele asemenea și poate fi formulat sub formă de creme, geluri, unguente, emulsii, soluții, elixiruri, loțiuni, suspensii, tincturi, paste, spume, aerosoli, irigații, spray-uri, supozitoare, bandaje, plasturi dermici sau orice alte formulări adecvate pentru administrare locală.

Un anticorp anti-CTLA-4 descris aici poate fi formulat ca un aerosol pentru aplicare topică, cum ar fi prin inhalare (a se vedea, *de exemplu*, Brevete U.S. nr. 4,044,126, 4,414,209 și 4,364,923, care descriu aerosoli pentru eliberarea unui steroid util pentru tratamentul bolilor inflamatorii, în special astmul). Aceste formulări pentru administrarea la tractul respirator pot fi sub formă de aerosol sau soluție pentru un nebulizator sau sub formă de pulbere microfină pentru insuflații, singure sau în combinație cu un purtător inert cum ar fi lactoza. Într-un astfel de caz, particulele formulării vor avea, într-o variantă de realizare, diametre mai mici de 50 microni, într-o variantă de realizare mai mici de 10 microni.

Un anticorp anti-CTLA-4 descris aici poate fi formulat pentru aplicarea locală sau topică, cum ar fi pentru aplicarea locală pe piele și membranele mucoase, cum ar fi în ochi, sub formă de geluri, creme și loțiuni și pentru aplicare pe ochi sau pentru aplicarea intracisternală sau intraspinală. Administrarea topică este avută în vedere pentru administrarea transdermică și, de asemenea, pentru administrarea la ochi sau mucoasă sau pentru terapii prin inhalare. Pot fi de asemenea administrate soluții nazale ale anticorpului singur sau în combinație cu alți excipienți acceptabili farmaceutic.

Plasturii transdermici, incluzând dispozitive iontoforetice și electroforetice, sunt bine cunoscuți specialiștilor în domeniu și pot fi utilizați pentru a administra un anticorp.

De exemplu, astfel de plasturi sunt dezvăluiți în Brevetele U.S. nr. 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, și 5,860,957.

În anumite variante de realizare, o compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia descrisă aici este o pulbere liofilizată, care poate fi reconstituită pentru administrare ca soluții, emulsii și alte amestecuri. Poate fi, de asemenea, reconstituită și formulată ca solide sau geluri. Pulberea liofilizată este preparată prin dizolvarea unui anticorp sau a unui fragment de legare la antigen al acestuia descris aici, sau a unui derivat acceptabil farmaceutic al acestuia, într-un solvent adecvat. În unele variante de realizare, pulberea liofilizată este sterilă. Solventul poate conține un excipient care îmbunătățește stabilitatea sau o altă componentă farmacologică a pulberii sau a soluției reconstituite, preparată din pulbere. Excipienții care pot fi utilizați includ, dar nu sunt limitați la, dextroză, sorbitol, fructoză, sirop de porumb, xilitol, glicerină, glucoză, zaharoză sau alt agent adecvat. Solventul poate conține, de asemenea, un tampon, cum ar fi citrat, fosfat de sodiu sau de potasiu sau alt astfel de tampon cunoscut specialiștilor în domeniu, într-o variantă de realizare, la un pH aproximativ neutru. Filtrarea sterilă ulterioară a soluției urmată de liofilizare în condiții standard cunoscute specialiștilor în domeniu furnizează formularea dorită. Într-o variantă de realizare, soluția rezultată va fi porționată în flacoane pentru liofilizare. Fiecare flacon va conține o singură doză sau mai multe doze de compus. Pulberea liofilizată poate fi păstrată în condiții adecvate, cum ar fi de la aproximativ 4°C la temperatura camerei. Reconstituirea acestei pulberi liofilizate cu apă pentru preparate injectabile furnizează o formulare pentru utilizarea în administrare parenterală. Pentru reconstituire, pulberea liofilizată este adăugată în apă sterilă sau alt purtător adecvat. Cantitatea exactă depinde de compusul selectat. O astfel de cantitate poate fi determinată empiric.

Anticorpilor anti-CTLA-4 descriși aici și alte compoziții furnizate aici pot fi, de asemenea, formulați pentru a fi țintiți către un țesut, receptor sau altă zonă particulară a corpului subiectului care urmează să fie tratat. Multe astfel de metode de țintire sunt bine cunoscute specialiștilor în domeniu. Toate aceste astfel de metode de țintire sunt avute în vedere aici pentru utilizarea în prezentele compoziții. Pentru exemple nelimitative de metode de țintire, a se vedea, de exemplu, Brevetele U.S. nr.

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 și 5,709,874. Într-o variantă de realizare specifică, un anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia descris aici este țintit la o tumoare.

Compozițiile destinate utilizării pentru administrarea *in vivo* pot fi sterile. Acest lucru este ușor de realizat prin filtrare, *de exemplu*, prin membrane de filtrare sterile.

5.4 Metode de utilizare și utilizări

Referirile la metodele de tratament din prezenta descriere trebuie să fie interpretate ca referiri la compuşii, compozițiile farmaceutice și medicamentele conform prezentei invenții pentru utilizarea într-o metodă de tratament a corpului uman (sau animal) prin terapie. Într-un alt aspect, prezenta dezvăluire furnizează o metodă de tratare a cancerului sau a unei boli infecțioase la un subiect utilizând anticorpii anti-CTLA-4 descriși aici. Este dezvăluit faptul că orice boală sau tulburare a unui subiect care ar putea beneficia de inhibarea funcției CTLA-4 poate fi tratată utilizând anticorpii anti-CTLA-4 descriși aici. Anticorpii anti-CTLA-4 descriși aici sunt utili în special pentru inhibarea toleranței sistemului imunitar la tumori și, în consecință, pot fi utilizați ca imunoterapie pentru subiecții cu cancer. De exemplu, este dezvăluită o metodă de creștere a activării celulelor T ca răspuns la un antigen la un subiect, metodă care cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente de anticorp anti-CTLA-4 sau compoziție farmaceutică a acestuia, așa cum este descris aici. În anumite variante de realizare, prezenta dezvăluire furnizează o metodă de tratare a cancerului la un subiect, metodă care cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente de anticorp sau compoziție farmaceutică, așa cum este descris aici.

Cancerale care pot fi tratate cu anticorpii, combinațiile terapeutice sau compozițiile farmaceutice descrise aici includ, fără limitare, cancerul solid (de exemplu, cancerul solid recidivat sau refractar și cancerul solid avansat sau metastatic), carcinomul, sarcomul, melanomul (de exemplu, melanom stadiul III sau stadiul IV), cancerul pulmonar cu celule mici, cancerul pulmonar cu celule non-mici, cancerul urotelial, cancerul ovarian, cancerul de prostată (de exemplu, cancerul de prostată

metastatic refractar hormonal și cancerul de prostată metastatic progresiv), cancerul pancreatic, cancerul de sân (de exemplu, cancer de sân HER2⁺ (de exemplu, cancer de sân HER2⁺ recidivat /refractar)), cancer de cap și gât (de exemplu, carcinom de cap și gât cu celule scuamoase recidivat /refractar (HNSCC)), gliom, gliom malign, glioblastom multiform, metastaze cerebrale, cancer merkel, cancer gastric, cancer gastroesofagian, carcinom cu celule renale, melanom uveal, cancer de colon, cancer de col uterin, limfom (de exemplu, limfom recidivat sau refractar), limfom non-Hodgkin, limfom Hodgkin, leucemie, și mielom multiplu. În anumite variante de realizare, cancerul este tratat prin administrarea intratumorală a unui anticorp, combinație terapeutică sau compoziție farmaceutică descrisă aici. Cancerelor care pot fi tratate prin administrarea intratumorală a anticorpilor, combinațiilor terapeutice sau compozițiilor farmaceutice descrise aici includ, fără limitare, tumori solide (de exemplu, tumori solide avansate sau metastatice), cancer de cap și gât (de exemplu, carcinom de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC) recidivat/refractar) și cancer de sân (de exemplu, cancer de sân HER2⁺ (de exemplu, cancer de sân HER2⁺ recidivat /refractar)).

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este o tumoare solidă. În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este un cancer metastatic sau avansat local (de exemplu, o tumoare solidă metastatică sau avansată local). În anumite variante de realizare, cancerul este tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici ca o primă terapie a cancerului după diagnosticarea tumorii metastatice sau avansate local (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticare). În anumite variante de realizare, cancerul este tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici ca o primă terapie a cancerului după diagnosticarea progresării tumorii (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticarea progresării tumorii) care a avut loc în pofida tratamentului anterior al tumorii cu o terapie diferită a cancerului, opțional în care metoda descrisă aici este furnizată ca a doua terapie administrată pentru cancer. În anumite variante de realizare, cancerul este tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici ca primă terapie a cancerului după diagnosticarea toxicității unei terapii diferite pentru cancer (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după

diagnosticare toxicității terapiei diferite pentru cancer), opțional, în care metoda descrisă aici este furnizată ca a doua terapie administrată pentru cancer. În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este un cancer metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoare solidă) pentru care nu este disponibilă nicio terapie standard. În alte variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este un cancer metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoare solidă) pentru care o terapie standard a eșuat (*adică*, cancerul a progresat după terapia standard). În anumite variante de realizare, o terapie eșuează dacă cancerul este refractar la terapie. În anumite variante de realizare, o terapie eșuează dacă cancerul recidivează după ce răspunde, total sau parțial, la terapie. În anumite variante de realizare, cancerul metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoarea solidă) a fost confirmat histologic sau citologic.

În anumite variante de realizare, cancerul este o tumoare solidă. În anumite variante de realizare, cancerul (de exemplu, tumoare solidă) exprimă PD-L1. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer (de exemplu, tumoare solidă) care prezintă o exprimare detectabilă (de exemplu, exprimare parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1% (de exemplu, cel puțin 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, sau 90%). În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer (de exemplu, tumoare solidă) care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1% (de exemplu, cel puțin 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, sau 90%). În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer (de exemplu, tumoare solidă) care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer (de exemplu, tumoare solidă) care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 5%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer (de exemplu, tumoare solidă) care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 25%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer (de exemplu, tumoare solidă)

care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 50%.

În anumite variante de realizare, cancerul metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoare solidă) exprimă PD-L1. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoare solidă) care prezintă o exprimare detectabilă (de exemplu, exprimare parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1% (de exemplu, cel puțin 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, sau 90%). În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoare solidă) care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1% (de exemplu, cel puțin 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, sau 90%). În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoare solidă) care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoare solidă) care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 5%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoare solidă) care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 25%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de cancer metastatic sau avansat local (de exemplu, tumoare solidă) care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 50%.

Pentru fiecare și oricare dintre metodele descrise aici care necesită un anumit procent de celule dintr-o probă care prezintă exprimare detectabilă (de exemplu, exprimare membranară, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1, exprimarea PD-L1 poate fi detectată prin orice metodă bine cunoscută în domeniu, incluzând, dar fără a se limita la, imunohistochimie. Teste imunohistochimice

exemplificative pentru măsurarea exprimării PD-L1 în celulele tumorale sunt furnizate în Hirsch și colab. (2017, J. Thoracic Oncol. 12(2): 208-222), Rimm și colab. (2017, JAMA Oncol. 3(8): 1051-1058), și Diggs și Hsueh (2017, Biomarker Res. 5:12).

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici este un cancer pulmonar metastatic sau avansat local cu celule non-mici (NSCLC). În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici este un cancer pulmonar metastatic cu celule non-mici (NSCLC). În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici este un NSCLC Stadiul IV, metastatic sau avansat local. În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici este un NSCLC Stadiul IV, metastatic. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC metastatic sau avansat local care prezintă o exprimare detectabilă (de exemplu, exprimare parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, sau 90%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC metastatic sau avansat local care prezintă o exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, sau 90%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC metastatic sau avansat local care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC metastatic sau avansat local care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 5%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC metastatic sau avansat local care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 25%. În anumite variante de realizare, procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC metastatic sau avansat local care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 50%. În anumite variante de realizare, NSCLC-ul metastatic sau avansat local nu are aberații tumorale genomice ale EGFR sau ALK. În anumite variante de realizare, NSCLC-ul metastatic sau avansat local nu are nicio mutație de

sensibilizare a EGFR (de exemplu, mutație care poate fi tratată cu un inhibitor de tirozin kinază incluzând erlotinib, gefitinib sau afatinib) sau de translocare a ALK. În anumite variante de realizare, subiectul având NSCLC metastatic sau avansat local nu a primit niciun tratament anterior cu chimioterapie sistemică pentru NSCLC metastatic sau avansat local. În anumite variante de realizare, NSCLC-ul metastatic sau avansat local este tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici ca o primă terapie a cancerului după diagnosticarea (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticare) a NSCLC-ului metastatic sau avansat local. În anumite variante de realizare, metoda cuprinde tratarea unui subiect având NSCLC (de exemplu, NSCLC Stadiul IV, metastatic, sau avansat local) utilizând un anticorp anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), sau compoziție farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4, în care procentul de celule tumorale dintr-o probă de NSCLC care prezintă exprimare membranară detectabilă (de exemplu, exprimare membranară parțială sau completă) a PD-L1 este de cel puțin 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, sau 90%, și în care metoda este furnizată ca o primă terapie a cancerului după diagnosticarea cancerului de col uterin (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticare).

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este un cancer de col uterin. În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este un carcinom cu celule scuamoase, carcinom adenoscuamos, sau adenocarcinom al colului uterin metastatic sau avansat local, nerezectabil. În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este un cancer de col uterin nerezectabil sau metastatic. În anumite variante de realizare, cancerul de col uterin a progresat după o terapie standard (de exemplu, a recidivat după terapia standard, sau este refractar la terapia standard). În anumite variante de realizare, terapia standard cuprinde o chimioterapie care conține platină. În anumite variante de realizare, chimioterapia care conține platină este selectată din grupul care constă din cisplatină, carboplatină, oxaliplatină, nedaplatină, satraplatină, picoplatină, triplatină, fenantriplatină, iproplatină, lobapatină, heptaplatină, lipoplatină și o combinație a acestora. În anumite variante de realizare, terapia standard cuprinde în plus o a doua chimioterapie. În anumite variante de

realizare, a doua chimioterapie este selectată din grupul care constă dintr-un analog de nucleotidă (de exemplu, gemcitabină), un antimetabolit de folat (de exemplu, pemetrexed) și un taxan (de exemplu, paclitaxel). În anumite variante de realizare, terapia standard este orice chimioterapie dublet pe bază de platină (PT-DC) (cunoscută și ca dublet care conține platină) cunoscută în domeniu. În anumite variante de realizare, PT-DC-ul cuprinde cisplatină și gemcitabină, cisplatină și pemetrexed, cisplatină și paclitaxel, carboplatină și paclitaxel, sau cisplatină și topotecan. Terapia standard (de exemplu, una care cuprinde un PT-DC) poate cuprinde opțional în plus una sau mai multe terapii suplimentare, cum ar fi bevacizumab. În anumite variante de realizare, terapia standard cuprinde paclitaxel și topotecan. În anumite variante de realizare, cancerul de col uterin este HPV pozitiv. În anumite variante de realizare, cancerul de col uterin este asociat cu instabilitatea microsateliților. În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este un carcinom cu celule scuamoase, carcinom adenoscuamos metastatic sau avansat local, nerezectabil, sau adenocarcinom de col uterin care a recidivat după un dublet care conține platină administrat pentru tratamentul bolii avansate (recurente, nerezectabile, sau metastatice). În anumite variante de realizare, cancerul de col uterin este tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici ca o primă terapie a cancerului după diagnosticarea cancerului de col uterin (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticare). În anumite variante de realizare, cancerul de col uterin este tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici ca primă terapie a cancerului după diagnosticarea progresării tumorii (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticarea progresării tumorii) care a avut loc în pofida tratamentului anterior al cancerului de col uterin cu o altă terapie pentru cancer, opțional în care metoda descrisă aici este furnizată ca a doua terapie administrată pentru cancer. În anumite variante de realizare, cancerul de col uterin este tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici ca primă terapie a cancerului după diagnosticarea toxicității unei terapii diferite pentru cancer (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticarea toxicității unei terapii diferite pentru cancer), opțional în care metoda descrisă aici este furnizată ca a doua terapie administrată pentru cancer. În anumite variante de realizare, metoda cuprinde tratarea unui subiect având cancer de col uterin (de exemplu, un carcinom cu celule

scuamoase, carcinom adenoscuamos, sau adenocarcinom al colului uterin metastatic sau avansat local nerezectabil) utilizând un anticorp anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4, în care metoda este furnizată ca o primă terapie a cancerului după diagnosticarea cancerului de col uterin (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticare). În anumite variante de realizare, metoda cuprinde tratarea unui subiect având cancer de col uterin (de exemplu, un carcinom cu celule scuamoase, carcinom adenoscuamos, sau adenocarcinom al colului uterin metastatic sau avansat local nerezectabil) utilizând un anticorp anti-CTLA-4 descris aici, de exemplu, AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau o compoziție farmaceutică care cuprinde un astfel de anticorp anti-CTLA-4, în care metoda este furnizată după diagnosticarea progresării tumorii (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticarea progresării tumorii) care a apărut în pofida tratamentului anterior al cancerului de col uterin cu o terapie diferită a cancerului sau furnizate după diagnosticul de toxicitate a unei terapii diferite pentru cancer (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticarea toxicității terapiei diferite a cancerului), și în care metoda descrisă aici este furnizată ca a doua terapie administrată pentru cancer.

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este un carcinom cutanat cu celule scuamoase (cSCC). În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este un carcinom cutanat cu celule scuamoase (cSCC) Stadiul IV. În anumite variante de realizare, cSCC-ul (de exemplu, cSCC Stadiul IV) nu este vindecabil cu radioterapie. În anumite variante de realizare, cSCC-ul Stadiul IV este diagnosticat histologic sau citologic în conformitate cu a opta ediție a manualului American Joint Committee on Cancer staging (AJCC-8). În anumite variante de realizare, cSCC-ul (de exemplu, cSCC Stadiul IV) este tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici ca o primă terapie a cancerului după diagnosticarea cSCC-ului (de exemplu, cSCC Stadiul IV) (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticare). În anumite variante de realizare, cSCC-ul (de exemplu, cSCC Stadiul IV) este tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici ca

primă terapie a cancerului după diagnosticarea progresării tumorii (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticare progresării tumorii) care a avut loc în pofida tratamentului anterior al cSCC (de exemplu, cSCC Stadiul IV) cu o terapie diferită pentru cancer, opțional în care metoda descrisă aici este furnizată ca a doua terapie administrată pentru cancer. În anumite variante de realizare, cSCC-ul (de exemplu, cSCC Stadiul IV) este tratat în conformitate cu o metodă descrisă aici ca primă terapie pentru cancer după diagnosticul de toxicitate a unei terapii diferite pentru cancer (de exemplu, în 1, 2, 3, 4, 5, sau 6 zile; 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 săptămâni; sau, 1, 2, 3, 4, 6, 8, sau 12 luni după diagnosticarea toxicității terapiei diferite a cancerului), opțional în care metoda descrisă aici este furnizată ca a doua terapie administrată pentru cancer.

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este limfom cu celule B (de exemplu, leucemie limfocitară cronică cu celule B, limfom non-Hodgkin cu celule B, limfom cutanat cu celule B, limfom mare difuz cu celule B), carcinom cu celule bazale, cancer de vezică urinară, blastom, metastază cerebrală, cancer de sân, limfom Burkitt, carcinom (de exemplu, adenocarcinom (de exemplu, de joncțiune gastroesofagiană)), cancer de col uterin, cancer de colon, cancer colorectal (cancer de colon și cancer rectal), carcinom endometrial, cancer esofagian, sarcom Ewing, limfom folicular, cancer gastric, carcinom de joncțiune gastroesofagiană, cancer gastrointestinal, glioblastom (*de exemplu*, glioblastom multiform, *de exemplu*, nou diagnosticat sau recurent), gliom, cancer de cap și gât (*de exemplu*, carcinom de cap și gât cu celule scuamoase), metastaze hepatice, limfom Hodgkin și non-Hodgkin, cancer renal (*de exemplu*, carcinom cu celule renale și tumoare Wilms), cancer laringian, leucemie (*de exemplu*, leucemie mielocitară cronică, leucemie cu celule păroase), cancer hepatic (*de exemplu*, carcinom hepatic și hepatom), cancer pulmonar (*de exemplu*, cancer pulmonar cu celule non-mici și cancer pulmonar cu celule mici), limfom limfoblastic, limfom, limfom cu celule manta, tumoare cerebrală metastazică, cancer metastazic, mielom (*de exemplu*, mielom multiplu), neuroblastom, melanom ocular, cancer orofaringian, osteosarcom, cancer ovarian, cancer pancreatic (*de exemplu*, adenocarcinom de duct pancreatic), cancer de prostată (*de exemplu*, refractar hormonal (*de exemplu*, rezistent la castrare), metastazic, metastazic refractar hormonal (*de exemplu*, rezistent la castrare, independent androgen)), carcinom cu

celule renale (*de exemplu*, metastazic), carcinom de glandă salivară, sarcom (*de exemplu*, rabdomiosarcom), cancer de piele (*de exemplu*, melanom (*de exemplu*, melanom metastazic)), sarcom de țesut moale, tumoare solidă, carcinom cu celule scuamoase, sarcom sinovia, cancer testicular, cancer tiroidian, cancer cu celule tranziționale (cancer cu celule uroteliale), melanom uveal (*de exemplu*, metastazic), carcinom verucos, cancer vulval, și macroglobulinemie Waldenstrom.

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este sarcom sau carcinom uman, *de exemplu*, fibrosarcom, mixosarcom, liposarcom, condrosarcom, sarcom osteogenic, cordon, angiosarcom, endoteliosarcom, limfangiosarcom, limfangioendoteliosarcom, sinoviom, mezoteliom, tumoare Ewing, leiomiosarcom, rabdomiosarcom, carcinom de colon, cancer pancreatic, cancer de sân, cancer ovarian, cancer de prostată, carcinom cu celule scuamoase, carcinom cu celule bazale, adenocarcinom, carcinom al glandei sudorifice, carcinom al glandei sebacee, carcinom papilar, adenocarcinoame papilare, cistadenocarcinom, carcinom medular, carcinom bronhogenic, carcinom cu celule renale (*de exemplu*, metastazic), hepatom, carcinom de duct biliar, coriocarcinom, seminom, carcinom embrional, tumoare Wilms, cancer de col uterin, tumoare testiculară, carcinom pulmonar, carcinom pulmonar cu celule mici, carcinom de vezică urinară, carcinom epitelial, gliom, glioblastom multiform, astrocitom, meduloblastom, craniofaringiom, ependimom, pinealom, hemangioblastom, neurom acustic, oligodendrogliom, meningiom, melanom, neuroblastom, sau retinoblastom.

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este angiosarcom.

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este o leucemie limfocitară acută sau leucemie mielocitară acută (*de exemplu*, mieloblastică, promielocitară, mielomonocitară, monocitară și eritroleucemie); leucemie cronică (leucemie mielocitară cronică (granulocitică) sau leucemie limfocitară cronică); boala Hodgkin; boala non-Hodgkin; leucemie mieloidă acută; limfom cu celule B; limfom cu celule T; limfom anaplazic cu celule mari; limfom intraocular; limfom folicular; limfom de intestin subțire; sau limfom de zonă marginală splenică.

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este mielom multiplu, macroglobulinemie Waldenstrom, boală de lanț greu, tumori stromale gastrointestinale, cancer de cap și/sau gât (*de exemplu*, carcinom cu celule scuamoase a hipofaringelui, carcinom cu celule scuamoase a laringelui, carcinom celular al orofaringelui, sau carcinom verucos al laringelui), sarcom stromal endometrial, sarcom mastocitar, sarcom de țesut moale la adult, sarcom uterin, carcinom cu celule merkel, carcinom urotelial, melanom cu metastaze cerebrale, melanom uveal, melanom uveal cu metastaze hepatice, cancer pulmonar cu celule non-mici, cancer rectal, sau sindrom mielodisplazic. În unele variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele este metastatic.

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este cancer de prostată, cancer de sân, cancer pulmonar, cancer colorectal, melanom, cancer bronhic, cancer de vezică urinară, cancer cerebral sau de sistem nervos central, cancer de sistem nervos periferic, cancer uterin sau endometrial, cancer al cavității orale sau al faringelui, limfom non-Hodgkin, cancer de tiroidă, cancer de rinichi, cancer de tract biliar, cancer de intestin subțire sau de apendice, cancer de glandă salivară, cancer de glandă tiroidă, cancer de glandă suprarenală, cancer cu celule scuamoase, mezoteliom, osteocarcinom, carcinom tiom/timic, glioblastom, sindrom mielodisplazic, sarcom de țesut moale, DIPG, adenocarcinom, osteosarcom, condrosarcom, leucemie, sau cancer pancreatic. În unele variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici include un carcinom (*de exemplu*, un adenocarcinom), limfom, blastom, melanom, sarcom, sau leucemie.

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este cancer cu celule scuamoase, cancer pulmonar cu celule mici, cancer pulmonar cu celule non-mici, cancer gastrointestinal, limfom Hodgkin, limfom non-Hodgkin, cancer pancreatic, glioblastom, gliom, cancer de col uterin, cancer ovarian, cancer hepatic (*de exemplu*, carcinom hepatic și hepatom), cancer de vezică urinară, cancer de sân, cancer de sân inflamator, carcinom cu celule Merkel, cancer de colon, cancer colorectal, cancer de stomac, cancer de vezică urinară, carcinom endometrial, mielom (*de exemplu*, mielom multiplu), carcinom de glandă salivară, cancer de rinichi

(*de exemplu*, carcinom al celulelor renale și tumori Wilms), carcinom cu celule bazale, melanom, cancer de prostată, cancer vulvar, cancer de tiroidă, cancer testicular, cancer esofagian, adenocarcinom seros sau diferite tipuri de cancer de cap și gât. În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici include melanom desmoplastic, cancer de sân inflamator, timom, cancer rectal, cancer anal, sau gliom de trunchi cerebral tratat chirurgical sau netratat chirurgical. Într-o variantă de realizare specifică, cancerul este o tumoare solidă. Într-o altă variantă de realizare specifică, cancerul este glioblastom multiform. În unele variante de realizare, glioblastomul multiform este recurent. În unele variante de realizare, glioblastomul multiform este nou diagnosticat. În unele variante de realizare, glioblastomul multiform este la un subiect având promotori MGMT nemetilați. În unele variante de realizare, glioblastomul multiform este refractar la terapia cu Bevacizumab. În unele variante de realizare, glioblastomul multiform este la un subiect care nu a primit terapie cu Bevacizumab.

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este melanom metastatic (*de exemplu*, melanom metastatic rezistent), cancer ovarian metastatic, sau carcinom metastatic al celulei renale. În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este melanom care este rezistent la Ipilimumab. În unele variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este melanom care este rezistent la Nivolumab sau Pembrolizumab. În unele variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este melanom care este rezistent la Ipilimumab și Nivolumab sau Pembrolizumab.

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este cancer de sân (*de exemplu*, cancer de sân rezistent la herceptin și cancer de sân rezistent la trastuzumab-DM1 (T-DM1)), cancer de prostată, glioblastom multiform, cancer colorectal, sarcom, cancer de vezică urinară, cancer de col uterin, cancere asociate HPV, cancere ale vaginului, cancere ale vulvei, cancere ale penisului, cancer de anus, cancer de rect, cancer de orofaringe, mielom multiplu, carcinom al celulei renale, cancer ovarian, cancer hepatocelular, cancer endometrial, cancer pancreatic, limfom, și leucemie (*de exemplu*, leucemie la vârstnic, leucemie mieloidă acută (AML), și AML la vârstnici).

În anumite variante de realizare, cancerul tratat în conformitate cu metodele descrise aici este melanom malign metastatic (de exemplu, melanom malign cutanat sau intraocular), cancer renal (*de exemplu*, carcinom cu celule clare), cancer de prostată (*de exemplu*, adenocarcinom de prostată refractar la hormoni), cancer de sân, cancer de colon, cancer pulmonar (*de exemplu*, cancer pulmonar cu celule non-mici), cancer osos, cancer pancreatic, cancer de piele, cancer al capului sau gâtului, cancer uterin, cancer ovarian, cancer rectal, cancer al regiunii anale, cancer de stomac, cancer testicular, cancer uterin, carcinom al trompelor uterine, carcinom al endometrului, carcinom al colului uterin, carcinom al vaginului, carcinom al vulvei, cancer al esofagului, cancer al intestinului subțire, cancer al sistemului endocrin, cancer al glandei tiroide, cancer al glandei paratiroide, cancer al glandei suprarenale, sarcom al țesuturilor moi, cancer al uretrei, cancer al penisului, leucemii cronice sau acute inclusiv leucemie mieloidă acută, leucemie mieloidă cronică, leucemie limfoblastică acută, leucemie limfocitară cronică, tumori solide ale copilărie, limfom limfocitar, cancer al vezicii urinare, cancer al rinichiului sau ureterului, carcinom al pelvisului renal, neoplasm al sistemului nervos central (SNC), limfom primar al SNC, angiogeneză tumorală, tumoare a axei spinale, gliom al trunchiului cerebral, gliom, adenom hipofizar, sarcom Kaposi, cancer epidermoid, cancer cu celule scuamoase, limfom cu celule T, cancere induse de mediu inclusiv cele induse de azbest, cancer esofagian, cancer hepatic, malignități refractare sau recurente, cancere metastatice, cancere care exprimă PD-L1 și combinații ale cancerelor menționate.

În anumite variante de realizare, subiectul a primit anterior o imunoterapie. În anumite variante de realizare, subiectul nu a primit anterior nicio imunoterapie. În anumite variante de realizare, cancerul este un cancer avansat sau metastatic.

În anumite variante de realizare, prezenta dezvăluire furnizează o metodă de tratare a unei boli infecțioase la un subiect, metodă care cuprinde administrarea la subiect a unei cantități eficiente dintr-un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică a acestuia, așa cum este descris aici. Într-o variantă de realizare, sunt furnizate aici metode pentru tratarea unei infecții (*de exemplu*, o infecție virală, o infecție bacteriană, o infecție fungică, o infecție cu protozoare sau o infecție parazitară). Infecția tratată în conformitate cu metodele poate fi cauzată de un agent

infecțios identificat aici. Într-o variantă de realizare specifică, un anticorp anti-CTLA-4 descris aici sau o compoziție a acestuia este singurul agent activ administrat unui subiect. În unele variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 descris aici sau o compoziție a acestuia se utilizează în combinație cu intervenții anti-infecțioase (de exemplu, antivirale, antibacteriene, antifungice sau anti-helmintice) pentru tratamentul bolilor infecțioase.

Bolile infecțioase care pot fi tratate cu anticorpi anti-CTLA-4 sau compoziții farmaceutice descrise aici sunt cauzate de agenți infecțioși incluzând, dar fără a se limita la bacterii, paraziți, ciuperci, protozoare și viruși. Într-o variantă de realizare specifică, boala infecțioasă tratată cu anticorpi anti-CTLA-4 sau compoziții farmaceutice descrise aici este cauzată de un virus. Bolile virale sau infecțiile virale care pot fi tratate în conformitate cu metodele descrise aici includ, dar nu se limitează la, cele cauzate de hepatita de tip A, hepatita de tip B, hepatita de tip C, gripa (*de exemplu*, gripa A sau gripa B), varicela, adenovirus, herpes simplex tip I (HSV-I), herpes simplex tip II (HSV-II), pesta bovină, rinovirus, echovirus, rotavirus, virus respirator sincițial, virus papiloma, virus papova, citomegalovirus, echinovirus, arbovirus, hantavirus, virus coxsackie, virusul oreionului, virusul rujeolei, virusul rubeolei, virusul poliomielitei, variola, virusul Epstein Barr, virusul imunodeficienței umane tip I (HIV-I), virusul imunodeficienței umane tip II (HIV- II) și agenți ai bolilor virale cum ar fi meningita virală, encefalita, dengue sau variola.

Infecțiile bacteriene care pot fi tratate includ infecțiile cauzate de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* și *Pseudomonas aeruginosa*. Boli bacteriene cauzate de bacterii (de exemplu, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans*, și *Pseudomonas aeruginosa*) care pot fi tratate în conformitate cu metodele descrise aici includ, dar nu sunt limitate la, *Mycobacteria rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (boala Lyme), *Bacillus anthracis* (antrax), tetanus, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *mycobacterium*, *pertissus*, holera, ciuma, difteria, *chlamydia*, *S. aureus* și *legionella*.

Bolile cu protozoare sau infecțiile cu protozoare cauzate de protozoare care pot

fi tratate în conformitate cu metodele descrise aici includ, dar nu se limitează la, leishmania, coccidioza, tripanosomul schistosom sau malaria. Bolile parazitare sau infecțiile parazitare cauzate de paraziți care pot fi tratate în conformitate cu metodele descrise aici includ, dar nu se limitează la, chlamydia și rickettsia.

Bolile fungice sau infecțiile fungice care pot fi tratate în conformitate cu metodele descrise aici includ, dar nu se limitează la, cele cauzate de infecții *Candida*, zigomicoză, mastită *Candida*, tricosporonoză diseminată progresivă cu tricosporonemie latentă, candidoză diseminată, paracoccidioidomicoză pulmonară, aspergiloză pulmonară, *Pneumocystis carinii* pneumonie, meningită criptococică, *coccidioides* meningoencefalită și vasculită cerebrospinală, infecție cu *Aspergillus niger*, *Fusarium keratitis*, micoze ale sinusului paranasal, endocardită *Aspergillus fumigatus*, discondroplazie tibială, vaginită *Candida glabrata*, candidoză orofaringiană, boală granulomatoasă cronică legată de X, tinea pedis, candidoză cutanată, placentită micotică, trichosporonoză diseminată, aspergiloză bronhopulmonară alergică, keratită micotică, infecție cu *Cryptococcus neoformans*, peritonită fungică, infecție cu *Curvularia geniculata*, endoftalmită stafilococică, sporotricoză și dermatofitoză.

În anumite variante de realizare, boala infecțioasă este acută. În anumite variante de realizare, boala infecțioasă este cronică. În anumite variante de realizare, boala infecțioasă este cauzată de flavivirus, de exemplu, virusul West Nile, virusul encefalitei Saint Louis, virusul Powassan, virusul encefalitei transmise de căpușe, virusul dengue, virusul zika, virusul bolii Kyasanur Forest, virusul febrei galbene și virusul chikungunya. În anumite variante de realizare, boala infecțioasă este cauzată de virusul Ebola. În anumite variante de realizare, boala infecțioasă este cauzată de virusul gripal. În anumite variante de realizare, boala infecțioasă este cauzată de Virusul Imunodeficienței Umane (HIV), virusul Hepatitei B (HBV) sau virusul Hepatitei C (HCV). În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau compoziția farmaceutică a acestuia, așa cum este descris aici, promovează controlul viral. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau compoziție farmaceutică a acestuia, așa cum este descris aici, elimină rezervoarele virale.

Un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și/sau o compoziție farmaceutică

conform invenției care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic, poate fi pentru utilizarea ca un medicament.

Un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției, și/sau utilizarea acestuia în combinație cu purtători sau excipienți acceptabili farmaceutic, pot fi pentru prepararea de compoziții farmaceutice sau medicamente pentru imunoterapie (de exemplu, o imunoterapie pentru creșterea activării celulelor T ca răspuns la un antigen la un subiect, tratarea cancerului sau tratarea bolilor infecțioase).

Prezenta invenție se referă într-un aspect la un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și/sau o compoziție farmaceutică conform invenției care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic, pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului.

Este dezvăluit un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și/sau o compoziție farmaceutică conform invenției care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic, pentru utilizarea într-o metodă de inhibare a toleranței sistemului imunitar la tumori și/sau pentru imunoterapie pentru subiecții cu cancer.

Prezenta invenție se referă într-un aspect la un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și/sau o compoziție farmaceutică conform invenției care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic, pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul unei boli infecțioase.

În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează ca o monoterapie.

În anumite variante de realizare, aceste metode cuprind în plus administrarea unui agent terapeutic suplimentar la subiect. În anumite variante de realizare, agentul terapeutic suplimentar este un agent chimioterapeutic sau un agent de țintire a punctului de control. În anumite variante de realizare, agentul de țintire a punctului de control este selectat din grupul care constă din un anticorp antagonist anti-PD-1, un

anticorp antagonist anti-PD-L1, un anticorp antagonist anti-PD-L2, un anticorp antagonist anti-CTLA-4, un anticorp antagonist anti-TIM-3, un anticorp antagonist anti-LAG-3, un anticorp antagonist anti-CEACAM1, un anticorp agonist anti-GITR, un anticorp agonist anti-OX40, un anticorp agonist anti-CD137, un anticorp agonist anti-DR3, un anticorp agonist anti-TNFSF14, și un anticorp agonist anti-CD27. În anumite variante de realizare, agentul de țintire a punctului de control este un anticorp antagonist anti-PD-1. În anumite variante de realizare, agentul de țintire a punctului de control este un anticorp antagonist anti-PD-L1. În anumite variante de realizare, agentul de țintire a punctului de control este un anticorp antagonist anti-LAG-3. În anumite variante de realizare, agentul terapeutic suplimentar este un agonist al unui membru al superfamiliei receptorilor factorului de necroză tumorală sau un membru al superfamiliei factorilor de necrozare tumorală.

(a) Un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și/sau o compoziție farmaceutică conform invenției care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic și (b) un agent terapeutic suplimentar, poate fi pentru utilizarea ca un medicament. Agentul terapeutic suplimentar poate fi un agent chimioterapeutic sau un agent de țintire a punctului de control.

(a) Un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și/sau o compoziție farmaceutică conform invenției care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic și (b) un agent terapeutic suplimentar, poate fi pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului.

(a) Un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și/sau o compoziție farmaceutică conform invenției care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic și (b) un agent terapeutic suplimentar, poate fi pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul unei boli infecțioase.

Un anticorp anti-CTLA-4 descris aici poate fi administrat unui subiect în combinație cu un compus care țintește o enzimă(e) imunomodulatoare, cum ar fi IDO (indoleamin-(2,3)-dioxigenaza) și/sau TDO (triptofan 2,3-dioxigenaza). Un astfel de compus poate fi selectat din grupul care constă din epacadostat (Incyte Corp; a se vedea, de exemplu, WO 2010/005958), F001287 (Flexus Biosciences), indoximod

(NewLink Genetics), și NLG919 (NewLink Genetics). Compusul poate fi epacadostat. Compusul poate fi F001287. Compusul poate fi indoximod. Compusul poate fi NLG919.

(a) Un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și/sau o compoziție farmaceutică conform invenției care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic și (b) un compus care țintește o enzimă imunomodulatoare, poate fi pentru utilizarea ca un medicament. Compusul poate ținti IDO și/sau TDO.

(a) Un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și/sau o compoziție farmaceutică conform invenției care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic și (b) un compus care țintește o enzimă imunomodulatoare, poate fi pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului. Compusul poate ținti IDO și/sau TDO.

Un anticorp anti-CTLA-4 descris aici poate fi administrat la un subiect în combinație cu un vaccin. În anumite variante de realizare, vaccinul este un vaccin tumoral pe bază de proteină de șoc termic sau un vaccin patogen pe bază de proteină de șoc termic. Un anticorp anti-CTLA-4 descris aici poate fi administrat la un subiect în combinație cu un vaccin tumoral pe bază de proteină de șoc termic. Proteinele de șoc termic (HSP-uri) sunt o familie de proteine extrem de conservate care se găsesc omniprezent la toate speciile. Exprimarea lor poate fi indusă puternic la niveluri mult mai mari ca urmare a șocului termic sau a altor forme de stres, inclusiv expunerea la toxine, stresul oxidativ sau privarea de glucoză. Cinci familii au fost clasificate în funcție de greutatea moleculară: HSP-110, -90, -70, -60 și -28. HSP-urile furnizează peptide imunogene prin calea de prezentare încrucișată în celulele prezentatoare de antigen (APC-uri), cum ar fi macrofagele și celulele dendritice (DC-urile), conducând la activarea celulelor T. HSP-urile funcționează ca purtători însoțitori ai peptidelor antigenice asociate tumorii formând complexi capabili să inducă imunitatea specifică tumorii. La eliberarea din celulele tumorale care mor, complexii HSP-antigen sunt preluați de celulele prezentatoare de antigen (APC-uri) în care antigenii sunt procesați în peptide care leagă moleculele MHC de clasa I și clasa II, conducând la activarea celulelor T CD8+ și CD4+ anti-tumorale. Imunitatea determinată de complexii HSP

derivați din preparate tumorale este direcționată specific împotriva repertoriului unic de peptide antigenice exprimat de cancerul fiecărui subiect.

Un complex peptidic de proteină de șoc termic (HSPPC) este un complex peptidic de proteină care constă dintr-o proteină de șoc termic complexată necovalent cu peptide antigenice. HSPPC-urile provoacă răspunsuri imune atât înnăscute, cât și adaptive. Peptidele antigenice pot prezenta antigenicitate pentru cancerul care este tratat. HSPPC-urile sunt capturate eficient de către APC-uri prin intermediul receptorilor de membrană (în principal CD91) sau prin legarea la receptori de tip Toll. Internalizarea HSPPC-urilor are ca rezultat maturarea funcțională a APC-urilor cu producția de chemokine și citokine care conduce la activarea celulelor ucigașe naturale (NK), a monocitelor și a răspunsurilor imune mediate de Th1 și Th-2. HSPPC-urile utilizate în metodele descrise aici pot cuprinde una sau mai multe proteine de șoc termic din familia de proteine de stres hsp60, hsp70, sau hsp90 complexate cu peptide antigenice. HSPPC-urile pot cuprinde hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, gp96, calreticulină, sau combinații a două sau mai multe dintre acestea.

Un anticorp anti-CTLA-4 descris aici poate fi administrat la un subiect în combinație cu un complex peptidic de proteină de șoc termic (HSPPC), *de exemplu*, complexul peptidic-96 de proteină de șoc termic (HSPCC-96), pentru tratarea cancerului. HSPPC-96 cuprinde o proteină de șoc termic de 96 kDa (Hsp), gp96, complexată cu peptide antigenice. HSPPC-96 este o imunoterapie pentru cancer fabricată din tumoarea unui subiect și conține "amprenta digitală" antigenică a cancerului. Această amprentă digitală poate conține antigeni unici care sunt prezenți numai în celulele canceroase specifice subiectului respectiv, și injectarea vaccinului are scopul de a stimula sistemul imunitar al subiectului să recunoască și să atace orice celule cu amprenta specifică a cancerului.

HSPPC-ul, *de exemplu*, HSPPC-96, poate fi produs din țesutul tumorii unui subiect. Într-o variantă de realizare specifică, HSPPC-ul (*de exemplu*, HSPPC-96) este produs dintr-o tumoare de tipul cancerului sau metastazei acestuia care este tratată. HSPPC-ul (*de exemplu*, HSPPC-96) poate fi autolog la subiectul care este tratat. În anumite variante de realizare, țesutul tumoral este țesut tumoral non-necrotic. Cel puțin 1 gram (*de exemplu*, cel puțin 1, cel puțin 2, cel puțin 3, cel puțin 4, cel puțin 5, cel

puțin 6, cel puțin 7, cel puțin 8, cel puțin 9, sau cel puțin 10 grame) de țesut tumoral non-necrotic poate fi utilizat pentru a produce un regim de vaccin. În anumite variante de realizare, după rezecția chirurgicală, țesutul tumoral non-necrotic este înghețat înainte de a fi utilizat la prepararea vaccinului. HSPPC-ul, *de exemplu*, HSPPC-96, poate fi izolat din țesutul tumoral prin tehnici de purificare, filtrat și preparat pentru un vaccin injectabil. Unui subiect i se pot administra 6-12 doze de HSPPC, *de exemplu*, HSPPC-96. Într-o astfel de dezvoltare, HSPPC-ul, *de exemplu*, dozele de HSPPC-96, pot fi administrate săptămânal pentru primele 4 doze și apoi la două săptămâni pentru cele 2-8 doze suplimentare.

Alte exemple de HSPPC-uri care pot fi utilizate în conformitate cu metodele descrise aici sunt dezvoltate în următoarele brevete și cereri de brevet, Brevetele U.S. nr. 6,391,306, 6,383,492, 6,403,095, 6,410,026, 6,436,404, 6,447,780, 6,447,781 și 6,610,659.

(a) Un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și/sau o compoziție farmaceutică conform invenției care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic și (b) un vaccin, poate fi pentru utilizarea ca un medicament. Vaccinul poate fi un vaccin tumoral pe bază de proteină de șoc termic sau un vaccin patogen pe bază de proteină de șoc termic. Vaccinul poate fi un vaccin viral pe bază de proteine de șoc termic.

(a) Un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și/sau o compoziție farmaceutică conform invenției care cuprinde un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției și un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic și (b) un vaccin, poate fi pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului. Vaccinul poate fi vaccin tumoral pe bază de proteină de șoc termic.

Anticorpul anti-CTLA-4 și agentul terapeutic suplimentar (de exemplu, chimioterapeutic, agent de țintire a punctului de control, inhibitor IDO și/sau vaccin) pot fi administrate separat, secvențial sau concomitent ca forme de dozare separate. Într-o variantă de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 este administrat parenteral, și un inhibitor IDO este administrat oral.

Un anticorp anti-CTLA-4 descris aici poate fi administrat la un subiect intratumoral. Un anticorp anti-CTLA-4 descris aici poate fi administrat la un subiect intratumoral în combinație cu un agent terapeutic suplimentar. Agentul terapeutic suplimentar poate fi administrat sistemic. Subiectul poate avea tumori solide. Subiectul poate avea carcinom de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC). Subiectul poate avea cancer de sân HER2⁺. Agentul terapeutic suplimentar care este administrat sistemic poate fi un anticorp anti-PD-1 (de exemplu, pembrolizumab sau nivolumab). Agentul terapeutic suplimentar care este administrat sistemic poate fi un anticorp anti-EGFR (de exemplu, cetuximab). Agentul terapeutic suplimentar care este administrat sistemic poate fi un anticorp anti-HER2 (de exemplu, trastuzumab). Agentul terapeutic suplimentar care este administrat sistemic poate fi un agent chimioterapeutic (de exemplu, gemcitabină). Subiectul are tumori solide și agentul terapeutic suplimentar care este administrat sistemic poate fi un anticorp anti-PD-1 (de exemplu, pembrolizumab sau nivolumab). Anticorpul anti-PD-1 poate fi pembrolizumab administrat la 200 mg la fiecare trei săptămâni. Subiectul poate avea carcinom de cap și gât cu celule scuamoase (HNSCC) și agentul terapeutic suplimentar care este administrat sistemic poate fi un anticorp anti-EGFR (de exemplu, cetuximab). Subiectul poate avea cancer de sân HER2⁺ și agentul terapeutic suplimentar care este administrat sistemic poate fi un anticorp anti-HER2 (de exemplu, trastuzumab). Subiectul poate să fi primit suplimentar un agent chimioterapeutic (de exemplu, gemcitabină). Într-un aspect, prezenta invenție se referă la un anticorp anti-CTLA-4 și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, și opțional un agent terapeutic suplimentar, pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului, în care anticorpul anti-CTLA-4 și/sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții este administrat intratumoral la subiect. Într-o variantă de realizare suplimentară, la subiect este administrat un agent terapeutic suplimentar, mai preferabil, la subiect este administrat suplimentar un agent terapeutic sistemic.

Un anticorp anti-PD-1 poate fi utilizat în metodele descrise aici. Anticorpul anti-PD-1 poate fi Nivolumab, cunoscut de asemenea ca BMS-936558 sau MDX1106, dezvoltat de Bristol-Myers Squibb. Anticorpul anti-PD-1 poate fi Pembrolizumab, cunoscut de asemenea ca Lambrolizumab sau MK-3475, dezvoltat de Merck & Co. Anticorpul anti-PD-1 poate fi Pidilizumab, cunoscut de asemenea ca CT-011, dezvoltat

de CureTech. Anticorpul anti-PD-1 poate fi MEDI0680, cunoscut de asemenea ca AMP-514, dezvoltat de Medimmune. Anticorpul anti-PD-1 poate fi PDR001 dezvoltat de Novartis Pharmaceuticals. Anticorpul anti-PD-1 poate fi REGN2810 dezvoltat de Regeneron Pharmaceuticals. Anticorpul anti-PD-1 poate fi PF-06801591 dezvoltat de Pfizer. Anticorpul anti-PD-1 poate fi BGB-A317 dezvoltat de BeiGene. Anticorpul anti-PD-1 poate fi TSR-042 dezvoltat de AnaptysBio și Tesaro. Anticorpul anti-PD-1 poate fi SHR-1210 dezvoltat de Hengrui.

Alte exemple nelimitative de anticorpi anti-PD-1 care pot fi utilizați în metodele de tratament descrise aici sunt dezvăluite în următoarele brevete și cereri de brevet de invenție: Brevet U.S. nr. 6,808,710; Brevet U.S. nr. 7,332,582; Brevet U.S. nr. 7,488,802; Brevet U.S. nr. 8,008,449; Brevet U.S. nr. 8,114,845; Brevet U.S. nr. 8,168,757; Brevet U.S. nr. 8,354,509; Brevet U.S. nr. 8,686,119; Brevet U.S. nr. 8,735,553; Brevet U.S. nr. 8,747,847; Brevet U.S. nr. 8,779,105; Brevet U.S. nr. 8,927,697; Brevet U.S. nr. 8,993,731; Brevet U.S. nr. 9,102,727; Brevet U.S. nr. 9,205,148; Publicația U.S. nr. US 2013/0202623 A1; Publicația U.S. nr. US 2013/0291136 A1; Publicația U.S. nr. US 2014/0044738 A1; Publicația U.S. nr. US 2014/0356363 A1; Publicația U.S. nr. US 2016/0075783 A1; și Publicația PCT nr. WO 2013/033091 A1; Publicația PCT nr. WO 2015/036394 A1; Publicația PCT nr. WO 2014/179664 A2; Publicația PCT nr. WO 2014/209804 A1; Publicația PCT nr. WO 2014/206107 A1; Publicația PCT nr. WO 2015/058573 A1; Publicația PCT nr. WO 2015/085847 A1; Publicația PCT nr. WO 2015/200119 A1; Publicația PCT nr. WO 2016/015685 A1; și Publicația PCT nr. WO 2016/020856 A1.

Un anticorp anti-PD-L1 poate fi utilizat în metodele descris aici. Anticorpul anti-PD-L1 poate fi atezolizumab dezvoltat de Genentech. Anticorpul anti-PD-L1 poate fi durvalumab dezvoltat de AstraZeneca, Celgene și Medimmune. Anticorpul anti-PD-L1 poate fi avelumab, cunoscut de asemenea ca MSB0010718C, dezvoltat de Merck Serono și Pfizer. Anticorpul anti-PD-L1 poate fi MDX-1105 dezvoltat de Bristol-Myers Squibb. Anticorpul anti-PD-L1 poate fi AMP-224 dezvoltat de Amplimmune și GSK.

Exemple nelimitative de anticorpi anti-PD-L1 care pot fi utilizați în metodele de tratament descrise aici sunt dezvăluite în următoarele brevete și cereri de brevet: Brevet US nr. 7,943,743; Brevet US nr. 8,168,179; Brevet US nr. 8,217,149; Brevet

U.S. nr. 8,552,154; Brevet U.S. nr. 8,779,108; Brevet U.S. nr. 8,981,063; Brevet U.S. nr. 9,175,082; Publicația U.S. nr. US 2010/0203056 A1; Publicația U.S. nr. US 2003/0232323 A1; Publicația U.S. nr. US 2013/0323249 A1; Publicația U.S. nr. US 2014/0341917 A1; Publicația U.S. nr. US 2014/0044738 A1; Publicația U.S. nr. US 2015/0203580 A1; Publicația U.S. nr. US 2015/0225483 A1; Publicația U.S. nr. US 2015/0346208 A1; Publicația U.S. nr. US 2015/0355184 A1; și Publicația PCT nr. WO 2014/100079 A1; Publicația PCT nr. WO 2014/022758 A1; Publicația PCT nr. WO 2014/055897 A2; Publicația PCT nr. WO 2015/061668 A1; Publicația PCT nr. WO 2015/109124 A1; Publicația PCT nr. WO 2015/195163 A1; Publicația PCT nr. WO 2016/000619 A1; și Publicația PCT nr. WO 2016/030350 A1.

Un anticorp anti-LAG-3 poate fi utilizat în metodele descris aici. Anticorpul anti-LAG-3 poate fi BMS-986016 dezvoltat de Bristol-Myers Squibb. Anticorpul anti-LAG-3 poate fi LAG525 dezvoltat de Novartis. Anticorpul anti-LAG-3 poate fi GSK2831781 dezvoltat de GSK.

Exemple nelimitative de anticorpi anti-LAG-3 care pot fi utilizați în metodele de tratament descrise aici sunt dezvăluite în următoarele brevete și cereri de brevet: Brevet US nr. 9,244,059; Publicația U.S. nr. US 2011/0150892 A1; Publicația U.S. nr. US 2014/0093511 A1; Publicația U.S. nr. US 2014/0286935 A1; Publicația U.S. nr. US 2015/0259420 A1; și Publicația PCT nr. WO 2015/042246 A1; Publicația PCT nr. WO 2015/116539 A1; Publicația PCT nr. WO 2015/200119 A1; și Publicația PCT nr. WO 2016/028672 A1.

Un anticorp anti-EGFR poate fi utilizat în metodele descris aici. Anticorpul anti-EGFR poate fi cetuximab dezvoltat de Bristol-Myers Squibb și ImClone, panitumumab dezvoltat de Abgenix și Amgen, nimotuzumab dezvoltat de CMI Cuba și YM BioSciences, necitumumab dezvoltat de ImClone, zalutumumab dezvoltat de Genmab, matuzumab dezvoltat de Takeda, Sym004 dezvoltat de Merck Serono și Symphogen, imgatuzumab dezvoltat de Glycart și Roche, duligotumab dezvoltat de Genentech și Roche, depatuxizumab dezvoltat de Abbott, depatuxizumab mafodotin dezvoltat de Abbvie, MM-151 dezvoltat de Adimab și Merrimack, GC1118 dezvoltat de Green Cross, AMG 595 dezvoltat de Amgen și ImmunoGen, CetuGEX dezvoltat de Glycotope, laprituximab emtansine dezvoltat de ImmunoGen, JNJ-61186372 dezvoltat

de Genmab și Janssen Biotech, SCT200 dezvoltat de Sinocelltech, LY3164530 dezvoltat de Lilly, HLX07 dezvoltat de Shanghai Henlius, sau SYN004 dezvoltat de Synermore.

Un anticorp anti-HER2 poate fi utilizat în metodele descris aici. Anticorpul anti-HER2 poate fi trastuzumab dezvoltat de Genentech și Roche, trastuzumab emtansină dezvoltat de Genentech și Roche, pertuzumab dezvoltat de Genentech, ertumaxomab dezvoltat de Fresenius, margetuximab dezvoltat de MacroGenics, MM-111 dezvoltat de Merrimack, CT-P06 dezvoltat de Celltrion, PF-05280014 dezvoltat de Pfizer, MM-302 dezvoltat de Merrimack, SB3 dezvoltat de Merck & Co, CMAB302 dezvoltat de Shanghai CP Guojian, TrasGEX dezvoltat de Glycotope, ARX788 dezvoltat de Ambrx și Zhejiang Medicine, SYD985 dezvoltat de Synthon, FS102 dezvoltat de Bristol-Myers Squibb și f-star, BCD-022 dezvoltat de Biocad, ABP 980 dezvoltat de Amgen, DS-8201a dezvoltat de Daiichi Sankyo, HLX02 dezvoltat de Shanghai Henlius, sau CANMAb dezvoltat de Biocon și Mylan.

Un anticorp sau o compoziție farmaceutică descrisă aici poate fi livrată la un subiect printr-o varietate de căi. Acestea includ, dar nu se limitează la, căile, parenterală, intranasală, intratraheală, orală, intradermică, topică, intramusculară, intraperitoneală, transdermică, intravenoasă, intratumorală, conjunctivală și subcutanată. Se poate folosi și administrarea pulmonară, *de exemplu*, prin utilizarea unui inhalator sau nebulizator, și formularea cu un agent de aerosolizare pentru utilizarea ca un spray. În anumite variante de realizare, anticorpul sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este livrat subcutanat sau intravenos. În anumite variante de realizare, anticorpul sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este livrat intratumoral. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este livrată la un ganglion limfatic de drenaj tumoral. În anumite variante de realizare, anticorpul sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este livrată prin intermediul unei administrări localizate (de exemplu, administrare subcutanată). În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este livrat sistemic. În anumite variante de realizare, anticorpul anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici este livrat local.

Un anticorp anti-CTLA-4 și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, și opțional un agent terapeutic suplimentar, poate fi pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului, în care anticorpul anti-CTLA-4 și/sau compoziție farmaceutică conform prezentei invenții este livrat intratumoral la subiect, este livrat la un ganglion limfatic de drenaj tumoral al unui subiect, sau este livrat prin intermediul unei administrări localizate (de exemplu, administrare subcutanată) la un subiect.

Cantitatea de anticorp sau compoziție care va fi eficientă în tratamentul și/sau prevenirea unei afecțiuni va depinde de natura bolii și poate fi determinată prin tehnici clinice standard.

Doza precisă care trebuie utilizată într-o compoziție va depinde, de asemenea, de calea de administrare și de gravitatea infecției sau a bolii cauzate de aceasta și ar trebui să fie decisă în funcție de judecata medicului și de circumstanțele fiecărui subiect. De exemplu, dozele eficiente pot varia, de asemenea, în funcție de mijloacele de administrare, situsul țintă, starea fiziologică a pacientului (inclusiv vârsta, greutatea corporală și starea de sănătate), dacă pacientul este uman sau animal, alte medicații administrate sau dacă tratamentul este profilactic sau terapeutic. Uzual, pacientul este un om, dar pot fi de asemenea tratate mamifere non-umane, inclusiv mamifere transgenice. Dozele de tratament sunt titrate optim pentru a optimiza siguranța și eficacitatea.

În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin injecție intravenoasă) la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, aproximativ 0,1 mg/kg, aproximativ 0,3 mg/kg, aproximativ 1 mg/kg, aproximativ 3 mg/kg, aproximativ 6 mg/kg, sau aproximativ 10 mg/kg. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) în fiecare săptămână, la fiecare două săptămâni, la fiecare trei săptămâni, la fiecare patru săptămâni, la fiecare șase săptămâni, la fiecare opt săptămâni, la fiecare douăsprezece săptămâni, în fiecare lună, la fiecare două luni, la fiecare trei luni, la fiecare patru luni, la fiecare cinci luni, la fiecare șase luni, la fiecare

opt luni și în fiecare an, de exemplu, la dozele descrise mai sus. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) la fiecare trei săptămâni în dozele descrise mai sus.

Un anticorp anti-CTLA-4 și/sau o compoziție farmaceutică conform prezentei invenții, și opțional un agent terapeutic suplimentar, poate fi pentru utilizarea într-o metodă pentru tratamentul cancerului, în care anticorpul anti-CTLA-4 și/sau compoziția farmaceutică conform prezentei invenții se administrează la un subiect la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, aproximativ 0,1 mg/kg, aproximativ 0,3 mg/kg, aproximativ 1 mg/kg, aproximativ 3 mg/kg, aproximativ 6 mg/kg, sau aproximativ 10 mg/kg, mai preferabil la fiecare două săptămâni, la fiecare trei săptămâni, fiecare patru săptămâni, fiecare șase săptămâni, sau fiecare douăsprezece săptămâni.

În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) la 0,1 mg/kg la fiecare două săptămâni, la fiecare trei săptămâni, fiecare patru săptămâni, fiecare șase săptămâni, sau fiecare douăsprezece săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) la 0,3 mg/kg la fiecare două săptămâni, la fiecare trei săptămâni, fiecare patru săptămâni, fiecare șase săptămâni, sau fiecare douăsprezece săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) la 1 mg/kg la fiecare două săptămâni, la fiecare trei săptămâni, fiecare patru săptămâni, fiecare șase săptămâni, sau fiecare douăsprezece săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) la 3 mg/kg la fiecare două săptămâni, la fiecare trei săptămâni, fiecare patru săptămâni, fiecare șase săptămâni, sau fiecare douăsprezece săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) la 6 mg/kg la fiecare

două săptămâni, la fiecare trei săptămâni, fiecare patru săptămâni, fiecare șase săptămâni, sau fiecare douăsprezece săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) la 10 mg/kg la fiecare două săptămâni, la fiecare trei săptămâni, fiecare patru săptămâni, fiecare șase săptămâni, sau fiecare douăsprezece săptămâni.

În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) la 0,1 mg/kg sau aproximativ 0,1 mg/kg la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) la 0,3 mg/kg sau aproximativ 0,3 mg/kg la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) la 1 mg/kg sau aproximativ 1 mg/kg la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) la 3 mg/kg sau aproximativ 3 mg/kg la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) la 6 mg/kg sau aproximativ 6 mg/kg la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect (de exemplu, prin intermediul unei injecții intravenoase) la 10 mg/kg sau aproximativ 10 mg/kg la fiecare trei săptămâni.

În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect prin intermediul unei injecții intratumorale la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, aproximativ 0,01 mg/kg, aproximativ 0,03 mg/kg, aproximativ 0,1 mg/kg, aproximativ 0,3 mg/kg, aproximativ 1 mg/kg, sau aproximativ 3 mg/kg. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect prin intermediul unei injecții intratumorale în fiecare

săptămână, la fiecare două săptămâni, la fiecare trei săptămâni, fiecare patru săptămâni, fiecare șase săptămâni, fiecare opt săptămâni, fiecare douăsprezece săptămâni, fiecare lună, fiecare două luni, la fiecare trei luni, fiecare patru luni, fiecare cinci luni, fiecare șase luni, fiecare opt luni, și fiecare an, de exemplu, în dozele descrise mai sus. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect prin intermediul unei injecții intratumorale la fiecare trei săptămâni în dozele descrise mai sus.

În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect prin intermediul unei injecții intratumorale de 0,01 mg/kg sau aproximativ 0,01 mg/kg la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect prin intermediul unei injecții intratumorale de 0,03 mg/kg sau aproximativ 0,03 mg/kg la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect prin intermediul unei injecții intratumorale de 0,1 mg/kg sau aproximativ 0,1 mg/kg la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect prin intermediul unei injecții intratumorale de 0,3 mg/kg sau aproximativ 0,3 mg/kg la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect prin intermediul unei injecții intratumorale la 1 mg/kg sau aproximativ 1 mg/kg la fiecare trei săptămâni. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect prin intermediul unei injecții intratumorale de 3 mg/kg sau aproximativ 3 mg/kg la fiecare trei săptămâni.

În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect prin intermediul unei administrări localizate (de exemplu, administrare subcutanată) de 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, aproximativ 0,01 mg/kg, aproximativ 0,03 mg/kg, aproximativ 0,1 mg/kg, aproximativ 0,3 mg/kg, aproximativ 1 mg/kg, sau aproximativ 3 mg/kg. În anumite variante de realizare, un anticorp anti-CTLA-4 sau o compoziție farmaceutică descrisă aici se administrează la un subiect prin intermediul

unei administrări localizate (de exemplu, administrare subcutanată) în fiecare săptămână, la fiecare două săptămâni, la fiecare trei săptămâni, fiecare patru săptămâni, fiecare șase săptămâni, fiecare opt săptămâni, fiecare douăsprezece săptămâni, fiecare lună, fiecare două luni, la fiecare trei luni, fiecare patru luni, fiecare cinci luni, fiecare șase luni, fiecare opt luni, și fiecare an, de exemplu, în dozele descrise mai sus.

În anumite variante de realizare, combinația terapeutică este administrată la un subiect timp de cel puțin 3, 6, 9, 12, 18, sau 24 luni. În anumite variante de realizare, combinația terapeutică este administrată la un subiect pentru un timp de până la 3, 6, 9, 12, 18, sau 24 luni.

Prezenta dezvăluire poate furniza o metodă de tratare a unui subiect care are angiosarcom, metodă care cuprinde administrarea la subiect (de exemplu, intravenos, intratumoral sau subcutanat) a unei cantități eficiente de anticorp anti-CTLA-4 sau compoziție farmaceutică descrisă aici. Prezenta dezvăluire poate furniza o metodă de tratarea unui subiect având angiosarcom, metodă care cuprinde administrarea la subiect intravenos un anticorp care se leagă în mod specific la CTLA-4 uman la 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, aproximativ 0,01 mg/kg, aproximativ 0,03 mg/kg, aproximativ 0,1 mg/kg, aproximativ 0,3 mg/kg, aproximativ 1 mg/kg, sau aproximativ 3 mg/kg, opțional fiecare una, două sau trei săptămâni. Prezenta dezvăluire poate furniza o metodă de tratare a unui subiect având angiosarcom, metodă care cuprinde administrarea intravenoasă la subiect a unui anticorp care se leagă în mod specific la CTLA-4 uman la 0,1 mg/kg o dată la fiecare trei săptămâni. Anticorpul cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 8 și o regiune variabilă a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 9. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 23; și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 24; și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27. În anumite variante de realizare, anticorpul cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 25; și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27. Într-o anumită dezvăluire, anticorpul

cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 26; și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27.

Un anticorp anti-CTLA-4 descris aici poate fi, de asemenea, utilizat pentru a analiza nivelurile de proteină CTLA-4 într-o probă biologică utilizând metode imunohistologice clasice cunoscute de specialiștii în domeniu, inclusiv imunoteste, cum ar fi testul de imunosorbent legat de enzime (ELISA), imunoprecipitarea sau Western blotting. Etichete adecvate de testare a anticorpilor sunt cunoscute în domeniu și includ etichete enzimatică, cum ar fi glucozoxidaza; radioizotopi, cum ar fi iod (^{125}I , ^{121}I), carbon (^{14}C), sulf (^{35}S), tritiu (^3H), indiu (^{121}In), și tehnețiu (^{99}Tc); etichete luminescente, cum ar fi luminol; și etichete fluorescente, cum ar fi fluoresceină și rodamină și biotină. Astfel de etichete pot fi utilizate pentru a eticheta un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia descris aici. Alternativ, un al doilea anticorp care recunoaște un anticorp anti-CTLA-4 sau un fragment de legare la antigen al acestuia descris aici poate fi etichetat și utilizat în combinație cu un anticorp anti-CTLA-4 sau un fragment de legare la antigen al acestuia pentru a detecta nivelurile de proteină CTLA-4. Un anticorp anti-CTLA-4 al invenției poate fi utilizat pentru testarea și/sau detectarea nivelurilor de proteină CTLA-4 într-o probă biologică *in vitro*.

Testarea nivelului de exprimare al proteinei CTLA-4 este destinată să includă măsurarea sau estimarea calitativă sau cantitativă a nivelului unei proteine CTLA-4 într-o primă probă biologică fie direct (*de exemplu*, prin determinarea sau estimarea nivelului absolut de proteină) fie relativ (*de exemplu*, prin compararea cu nivelul de proteină asociat bolii într-o a doua probă biologică). Nivelul de exprimare al polipeptidei CTLA-4 în prima probă biologică poate fi măsurat sau estimat și comparat cu un nivel standard de proteină CTLA-4, standardul fiind prelevat dintr-o a doua probă biologică obținută de la un individ care nu are tulburarea sau fiind determinat prin medierea nivelurilor dintr-o populație de indivizi care nu suferă de tulburare. Așa cum va fi apreciat în domeniu, odată ce nivelul de polipeptidă CTLA-4 "standard" este cunoscut, acesta poate fi utilizat în mod repetat ca standard pentru comparare.

Așa cum se utilizează aici, termenul "probă biologică" se referă la orice probă biologică obținută de la un subiect, linie celulară, țesut sau altă sursă de celule care pot exprima CTLA-4. Metode de obținere a biopsiilor tisulare și a fluidelor corporale de

la animale (*de exemplu*, oameni) sunt bine cunoscute în domeniu. Probele biologice includ celule sanguine mononucleare periferice.

Un anticorp anti-CTLA-4 sau fragment de legare la antigen al acestuia descris aici poate fi utilizat pentru aplicații de prognostic, diagnostic, monitorizare și screening, inclusiv aplicații *in vitro* și *in vivo* bine cunoscute și standard pentru specialiștii în domeniu și bazate pe prezenta descriere. Teste și kituri de prognostic, diagnostic, monitorizare și screening pentru evaluarea *in vitro* și evaluarea stării sistemului imunitar și/sau a răspunsului imunitar pot fi utilizate pentru a prezice, diagnostica și monitoriza pentru a evalua probe de pacienți, inclusiv cei cunoscuți ca având sau suspectați că au o disfuncție a sistemului imunitar sau cu privire la un răspuns anticipat sau dorit al sistemului imunitar, răspuns la antigen sau răspuns la vaccin. Evaluarea și evaluarea stării sistemului imunitar și/sau a răspunsului imunitar este, de asemenea, utilă pentru a se determina nivelul de potrivire al unui pacient pentru un studiu clinic al unui medicament sau pentru administrarea unui anumit agent chimioterapeutic sau a unui anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia, inclusiv combinații ale acestora, față de un alt agent sau anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia. Acest tip de monitorizare și evaluare prognostică și diagnostică este deja în practică utilizând anticorpi împotriva proteinei HER2 în cancerul de sân (HercepTest™, Dako) unde testul se utilizează și pentru a evalua pacienții pentru terapia cu anticorpi folosind Herceptin®. Aplicațiile *In vivo* includ terapia celulară direcționată și modularea sistemului imunitar și radioimagistica răspunsurilor imune.

Un anticorp anti-CTLA-4 și/sau o compoziție farmaceutică conform prezentei invenții pot fi pentru utilizarea ca un diagnostic.

Un anticorp anti-CTLA-4 și/sau o compoziție farmaceutică conform prezentei invenții pot fi pentru utilizarea într-o metodă pentru prezicerea, diagnosticarea și/sau monitorizarea unei disfuncții a sistemului imunitar și/sau cancer.

Un anticorp anti-CTLA-4 conform invenției, poate fi utilizat pentru prezicerea, diagnosticarea și/sau monitorizarea unei disfuncții a sistemului imunitar și/sau a unui cancer la un subiect prin testarea și/sau detectarea nivelurilor de proteină CTLA-4 într-o probă biologică a subiectului *in vitro*.

Un anticorp anti-CTLA-4 sau fragment de legare la antigen al acestuia poate fi utilizat în imunohistochimie probelor de biopsie. Un anticorp anti-CTLA-4 sau fragment de legare la antigen al acestuia poate fi utilizat pentru a detecta niveluri de CTLA-4 sau niveluri de celule care conțin CTLA-4 pe suprafața membranei lor, niveluri care pot fi apoi legate de anumite simptome ale bolii. Anticorpii anti-CTLA-4 sau fragmente de legare la antigen ale acestora descrise aici pot purta o etichetă detectabilă sau funcțională. Atunci când sunt utilizate etichete cu fluorescență, microscopia disponibilă în prezent și analiza de sortare a celulelor activate cu fluorescență (FACS) sau o combinație a ambelor metode, proceduri cunoscute în domeniu pot fi utilizate pentru a identifica și a cuantifica membrii de legare specifici. Anticorpii anti-CTLA-4 sau fragmente de legare la antigen ale acestora descrise aici pot purta o etichetă de fluorescență. Etichete de fluorescență exemplare includ, de exemplu, sonde reactive și conjugate, de exemplu aminocumarină, fluoresceină și roșu Texas, coloranți Alexa Fluor, coloranți Cy și coloranți DyLight. Un anticorp anti-CTLA-4 sau fragment de legare la antigen al acestuia poate purta o etichetă radioactivă, cum ar fi izotopii ^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 și ^{186}Re . Când sunt utilizate etichete radioactive, procedurile de contorizare disponibile în prezent, cunoscute în domeniu, pot fi utilizate pentru a identifica și cuantifica legarea specifică a anticorpului anti-CTLA-4 sau a fragmentului de legare la antigen al acestuia la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman). În cazul în care eticheta este o enzimă, detectarea poate fi realizată prin oricare dintre tehnicile colorimetrice, spectrofotometrice, fluorospectrofotometrice, amperometrice sau gazometrice utilizate în prezent, așa cum sunt cunoscute în domeniu. Acest lucru poate fi realizat prin punerea în contact a unei probe sau a unei probe martor cu un anticorp anti-CTLA-4 sau un fragment de legare la antigen al acestuia în condiții care permit formarea unui complex între anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia și CTLA-4. Orice complexe formați între anticorpul sau un fragment de legare la antigen al acestuia și CTLA-4 sunt detectați și comparați între probă și martor. În lumina legării specifice a anticorpilor descriși aici pentru CTLA-4, anticorpii sau fragmentele de legare la antigen ale acestora pot fi utilizați pentru a detecta specific exprimarea CTLA-4 pe suprafața celulelor. Anticorpii sau fragmentele de legare la antigen ale acestora descrise aici pot fi, de asemenea, utilizate pentru a purifica CTLA-4 prin purificare de imunoafinitate. De asemenea, este inclus aici un sistem de testare

care poate fi preparat sub forma unui kit de testare pentru analiza cantitativă a nivelului de prezență a, de exemplu, CTLA-4 sau complexi de ligand CTLA-4/CTLA-4. Sistemul sau kitul de testare poate cuprinde o componentă etichetată, *de exemplu*, un anticorp etichetat și unul sau mai mulți reactivi imunochimici suplimentari.

Este dezvăluită o metodă *in vitro* pentru testarea și/sau detectarea nivelurilor de proteină CTLA-4 într-o probă biologică care cuprinde (1) punerea în contact a unei probe și, opțional, a unei probe martor cu un anticorp anti-CTLA-4 sau un fragment de legare la antigen al acestuia conform invenției în condiții care permit formarea unui complex între anticorp sau fragmentul de legare la antigen al acestuia și CTLA-4 și (2) detectarea și compararea complexelor formați în probă și opțional martorul.

5.5 Polinucleotide, vectori și metode de producere a anticorpilor anti-CTLA-4

Într-un alt aspect, sunt furnizate aici polinucleotide care cuprind o secvență de nucleotide care codifică un lanț greu și un lanț ușor a unui anticorp conform invenției care se leagă în mod specific la un antigen de CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), și vectori, *de exemplu*, vectori care cuprind astfel de polinucleotide pentru exprimarea recombinantă în celule gazdă (*de exemplu*, *E. coli* și celule de mamifere). Sunt furnizate aici polinucleotide care cuprind secvențe de nucleotide care codifică un lanț greu și un lanț ușor al anticorpului conform invenției, precum și vectori care cuprind astfel de secvențe de polinucleotide, *de exemplu*, vectori de exprimare pentru exprimarea lor eficientă în celule gazdă, *de exemplu*, celule de mamifere.

Așa cum se utilizează aici, o polinucleotidă "izolată" sau moleculă de acid nucleic este una care este separată de alte molecule de acid nucleic care sunt prezente în sursa naturală (*de exemplu*, la un șoarece sau un om) a moleculei de acid nucleic. Mai mult, o moleculă de acid nucleic "izolată", cum ar fi o moleculă de ADNc, poate fi substanțial lipsită de alt material celular sau mediu de cultură atunci când este produsă prin tehnici recombinante, sau substanțial lipsită de precursori chimici sau alte substanțe chimice atunci când este sintetizată chimic. De exemplu, limbajul "substanțial liber" include preparate de polinucleotidă sau moleculă de acid nucleic având mai puțin de aproximativ 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, sau 0,1% (în particular mai puțin de aproximativ 10%) dintr-un alt material, *de exemplu*, material celular,

mediu de cultură, alte molecule de acid nucleic, precursori chimici și/sau alte substanțe chimice. Într-o variantă de realizare specifică, o moleculă(e) de acid nucleic care codifică un anticorp descris aici este izolată sau purificată.

Sunt dezvăluite aici polinucleotide care cuprind secvențe de nucleotide care codifică anticorpi sau fragmente de legare la antigen ale acestora, care se leagă în mod specific la o polipeptidă CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și cuprind o secvență de aminoacizi așa cum este descrisă aici, precum și anticorpi care concurează cu astfel de anticorpi pentru legarea la o polipeptidă CTLA-4 (*de exemplu*, într-o manieră dependentă de doză), sau care se leagă de același epitop ca și cel al unor astfel de anticorpi.

În anumite aspecte, sunt furnizate aici polinucleotide care cuprind o secvență de nucleotide care codifică lanțul ușor și lanțul greu al unui anticorp descris aici. Este dezvăluit faptul că polinucleotidele pot cuprinde secvențe de nucleotide care codifică un lanț ușor care cuprinde FR-urile și CDR-urile de VL ale anticorpilor descriși aici (a se vedea, *de exemplu*, Tabelul 1).

De asemenea, sunt dezvăluite polinucleotide care codifică un anticorp anti-CTLA-4 care sunt optimizate, *de exemplu*, prin optimizare codon/ARN, înlocuirea cu secvențe semnal heteroloage și eliminarea elementelor de instabilitate ARNm. Metode de generare a acizilor nucleici optimizați care codifică un anticorp anti-CTLA-4 sau un fragment al acestuia (*de exemplu*, lanț ușor, lanț greu, domeniu VH, sau domeniu VL) pentru exprimarea recombinantă prin introducerea modificărilor de codon și/sau eliminarea regiunilor inhibitoare din ARNm poate fi realizată prin adaptarea metodelor de optimizare descrise în, *de exemplu*, Brevetele U.S. nr. 5,965,726; 6,174,666; 6,291,664; 6,414,132; și 6,794,498, în consecință. De exemplu, potențiale situsuri de matisare și elemente de instabilitate (*de exemplu*, elemente bogate A/T sau A/U) din ARN pot fi mutate fără a altera aminoacizii codificați de secvențele de acid nucleic pentru a crește stabilitatea ARN-ului pentru exprimarea recombinantă. Alterările folosesc degenerarea codului genetic, *de exemplu*, folosind un codon alternativ pentru un aminoacid identic. În unele variante de realizare, poate fi de dorit să se modifice unul sau mai mulți codoni pentru a codifica o mutație conservativă, *de exemplu*, un aminoacid similar cu structură și proprietăți chimice similare și/sau funcție la fel cu a

aminoacidului inițial. Astfel de metode pot crește exprimarea unui anticorp anti-CTLA-4 sau a unui fragment al acestuia cu cel puțin de 1 ori, 2 ori, 3 ori, 4 ori, 5 ori, 10 ori, 20 ori, 30 ori, 40 ori, 50 ori, 60 ori, 70 ori, 80 ori, 90 ori, sau 100 ori sau mai mult în raport cu exprimarea unui anticorp anti-CTLA-4 codificat de polinucleotide care nu au fost optimizate.

Într-o anumită dezvăluire, o secvență de polinucleotidă optimizată care codifică un anticorp anti-CTLA-4 descris aici sau un fragment al acestuia (*de exemplu*, domeniu VL și/sau domeniu VH) se pot hibridiza cu un antisens (*de exemplu*, complementar) polinucleotidă a unei secvențe de polinucleotide neoptimizate care codifică un anticorp anti-CTLA-4 descris aici sau un fragment al acestuia (*de exemplu*, domeniu VL și/sau domeniu VH). Într-o dezvăluire specifică, o secvență de nucleotide optimizată care codifică un anticorp anti-CTLA-4 descris aici sau un fragment hibridizează în condiții de stringență ridicată la polinucleotida antisens a unei secvențe de polinucleotide neoptimizată care codifică un anticorp anti-CTLA-4 sau un fragment al acestuia descris aici. Într-o variantă de realizare specifică, o secvență de nucleotide optimizată care codifică un anticorp anti-CTLA-4 descris aici sau un fragment al acestuia hibridizează în condiții de hibridizare de stringență mare, intermediară sau scăzută la o polinucleotidă antisens a unei secvențe de nucleotide neoptimizată care codifică un anticorp anti-CTLA-4 descris aici sau un fragment al acestuia. Au fost descrise informații privind condițiile de hibridizare, a se vedea, *de exemplu*, Publicația cererii de brevet U.S. nr. US 2005/0048549 (*de exemplu*, paragrafele 72-73).

Polinucleotidele pot fi obținute, iar secvența de nucleotide a polinucleotidelor poate fi determinată, prin orice metodă cunoscută în domeniu. Secvențe de nucleotide care codifică anticorpii descriși aici, *de exemplu*, anticorpii descriși în Tabelul 1 și versiunile modificate ale acestor anticorpi pot fi determinate folosind metode bine cunoscute în domeniu, *adică*, codonii de nucleotide despre care se cunoaște că, codifică anumiți aminoacizi sunt asamblați astfel încât să genereze un acid nucleic care codifică anticorpusul. O astfel de polinucleotidă care codifică anticorpusul poate fi asamblată din oligonucleotide sintetizate chimic (*de exemplu*, așa cum este descris în Kutmeier G și colab., (1994), BioTechniques 17: 242-6), care, pe scurt, implică sinteza oligonucleotidelor suprapuse care conțin porțiuni ale secvenței care codifică anticorpusul,

recoacerea și ligarea acelor oligonucleotide, și apoi amplificarea oligonucleotidelor ligate prin PCR.

Alternativ, o polinucleotidă care codifică un anticorp descris aici poate fi generată dintr-un acid nucleic dintr-o sursă adecvată (*de exemplu*, un hibridom) folosind metode bine cunoscute în domeniu (*de exemplu*, PCR și alte metode de clonare moleculară). De exemplu, amplificarea PCR folosind primeri sintetici hibridizabili la capetele 3' și 5' ale unei secvențe cunoscute poate fi efectuată utilizând ADN genomic obținut din celulele hibridom care produc anticorpul de interes. Astfel de metode de amplificare PCR pot fi utilizate pentru a se obține acizi nucleici care cuprind secvența care codifică lanțul ușor și/sau lanțul greu al unui anticorp. Astfel de metode de amplificare PCR pot fi utilizate pentru a se obține acizi nucleici care cuprind secvența care codifică regiunea variabilă a lanțului ușor și/sau regiunea variabilă a lanțului greu a unui anticorp. Acizii nucleici amplificați pot fi clonați în vectori pentru exprimarea în celulele gazdă și pentru clonarea ulterioară, de exemplu, pentru a genera anticorpi himerici și umanizați.

Dacă o clonă care conține un acid nucleic care codifică un anumit anticorp nu este disponibilă, dar secvența moleculei de anticorp este cunoscută, un acid nucleic care codifică imunoglobulina poate fi sintetizat chimic sau obținut dintr-o sursă adecvată (*de exemplu*, o bibliotecă de ADNc de anticorpi sau o bibliotecă de ADNc generată din, sau un acid nucleic, de preferință ARN poli A+, izolat din orice țesut sau celule care exprimă anticorpul, cum ar fi celulele hibridom selectate pentru a exprima un anticorp descris aici) prin amplificare PCR folosind primeri sintetici hibridizabili la capetele 3' și 5' ale secvenței sau prin clonare folosind o sondă de oligonucleotidă specifică pentru secvența particulară a genei pentru a identifica, *de exemplu*, o clonă de ADNc dintr-o bibliotecă de ADNc care codifică anticorpul. Acizii nucleici amplificați generați prin PCR pot fi apoi clonați în vectori de clonare replicabili utilizând orice metodă bine cunoscută în domeniu.

ADN-ul care codifică anticorpii anti-CTLA-4 descriși aici poate fi izolat și secvențiat cu ușurință folosind proceduri convenționale (*de exemplu*, prin utilizarea sondelor oligonucleotidice care sunt capabile să se lege specific la genele care codifică lanțurile grele și ușoare ale anticorpilor anti-CTLA-4). Celulele hibridom pot servi ca o

sursă de astfel de ADN. Odată izolat, ADN-ul poate fi plasat în vectori de exprimare, care sunt apoi transfectați în celule gazdă, cum ar fi celule *E. coli* celule COS simiane, celule ovariene de hamster chinezesc (CHO) (*de exemplu*, celule CHO din CHO GS Sistem™ (Lonza)), sau celule de mielom care altfel nu produc proteină imunoglobulină, pentru a se obține sinteza anticorpilor anti-CTLA-4 în celulele gazdă recombinante.

Pentru a genera anticorpi întregi, primeri PCR care includ secvențe de nucleotide VH sau VL, un situs de restricție și o secvență de flancare pentru a proteja situsul de restricție pot fi utilizați pentru a amplifica secvențele VH sau VL în clonele scFv. Utilizând tehnici de clonare cunoscute specialiștilor în domeniu, domeniile VH amplificate prin PCR pot fi clonate în vectori care exprimă o regiune constantă a lanțului greu, *de exemplu*, regiunea constantă gamma 4 umană și domeniile VL amplificate prin PCR pot fi clonate în vectori care exprimă o regiune constantă a lanțului ușor, *de exemplu*, regiuni constante umane kappa sau lambda. În anumite variante de realizare, vectorii pentru exprimarea domeniilor VH sau VL cuprind un promotor EF-1 α , un semnal de secreție, un situs de clonare pentru regiunea variabilă, domenii constante și un marker de selecție cum ar fi neomicina. Domeniile VH și VL pot fi, de asemenea, clonate într-un vector care exprimă regiunile constante necesare. Vectorii de conversie a lanțului greu și vectorii de conversie a lanțului ușor sunt apoi co-transfectați în linii celulare pentru a genera linii celulare stabile sau tranzitorii care exprimă anticorpi de lungime completă, *de exemplu*, IgG, folosind tehnici cunoscute specialiștilor în domeniu.

De asemenea, ADN-ul poate fi modificat, de exemplu, prin substituirea secvenței de codificare pentru domeniile constante ale lanțului greu și ușor uman în locul secvențelor murine sau prin unirea covalentă la secvența de codificare a imunoglobulinei, în întregime sau parțial a unei secvențe de codificare a unei polipeptide non-imunoglobulină.

De asemenea, sunt furnizate polinucleotide care hibridizează în condiții de hibridizare de stringență mare, intermediară sau scăzută la polinucleotide care codifică un anticorp descris aici. În variante de realizare specifice, polinucleotidele descrise aici hibridizează în condiții de hibridizare de stringență ridicată, intermediară sau scăzută la polinucleotide care codifică un domeniu VH și/sau un domeniu VL furnizat aici.

Condițiile de hibridizare au fost descrise în domeniu și sunt cunoscute unui specialist în domeniu. De exemplu, hibridizarea în condiții stringente poate implica hibridizarea la ADN legat de filtru în 6x clorură de sodiu/citrat de sodiu (SSC) la aproximativ 45°C urmată de una sau mai multe spălări în 0,2xSSC/0,1% SDS la aproximativ 50-65°C; hibridizarea în condiții de stringență ridicată poate implica hibridizarea cu acid nucleic legat de filtru în 6xSSC la aproximativ 45°C urmată de una sau mai multe spălări în 0,1xSSC/0,2% SDS la aproximativ 68°C. Hibridizarea în alte condiții de stringență de hibridizare sunt cunoscute de cei de specialitate în domeniu și au fost descrise, a se vedea, de exemplu, Ausubel FM și colab., eds, (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. și John Wiley & Sons, Inc, New York la paginile 6.3.1-6.3.6 și 2.10.3.

În anumite aspecte, sunt furnizate aici celule (*de exemplu*, celule gazdă) care exprimă (*de exemplu*, recombinant) anticorpi descriși aici care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și polinucleotide și vectori de exprimare înrudiți. Sunt furnizați aici vectori (*de exemplu*, vectori de exprimare) care cuprind polinucleotide care cuprind secvențe de nucleotide care codifică anticorpi anti-CTLA-4 pentru exprimarea recombinantă în celule gazdă, de preferință în celule de mamifere. De asemenea, sunt furnizate aici celule gazdă care cuprind astfel de vectori pentru exprimarea recombinantă a anticorpilor anti-CTLA-4 descriși aici (*de exemplu*, anticorp uman sau umanizat). Într-un aspect particular, sunt furnizate aici metode pentru producerea unui anticorp descrise aici, care cuprinde exprimarea unui astfel de anticorp dintr-o celulă gazdă.

Exprimarea recombinantă a unui anticorp descris aici (*de exemplu*, un anticorp cu lungime completă, un lanț greu și/sau ușor al unui anticorp sau un anticorp cu un singur lanț descris aici) care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) implică construirea unui vector de exprimare care conține o polinucleotidă care codifică anticorpul. Odată ce a fost obținută o polinucleotidă care codifică o moleculă de anticorp, un lanț greu și/sau ușor al unui anticorp sau un fragment al acestuia (*de exemplu*, regiuni variabile ale lanțului greu și/sau ușor) descrise aici, vectorul pentru producerea moleculei de anticorp poate fi produs prin tehnologia de ADN recombinant utilizând tehnici bine cunoscute în domeniu. Astfel, metode pentru prepararea unei

proteine prin exprimarea unei polinucleotide care conține un anticorp sau un fragment de anticorp (*de exemplu*, lanț ușor sau lanț greu) care codifică secvența de nucleotide sunt descrise aici. Metode care sunt bine cunoscute specialiștilor în domeniu pot fi utilizate pentru a construi vectori de exprimare care conțin un anticorp sau fragment de anticorp (*de exemplu*, lanț ușor sau lanț greu) secvențe de codificare și semnale adecvate de control transcripțional și translațional. Aceste metode includ, de exemplu, tehnici ADN recombinant, tehnici sintetice *in vitro*, și recombinație genetică *in vivo*. De asemenea, sunt furnizați vectori replicabili care cuprind o secvență de nucleotide care codifică o moleculă de anticorp descrisă aici, un lanț greu sau ușor al unui anticorp, o regiune variabilă a unui lanț greu sau ușor a unui anticorp sau un fragment al acestuia sau un CDR de lanț greu sau ușor, legat operabil unui promotor. Astfel de vectori pot include, de exemplu, secvența de nucleotide care codifică regiunea constantă a moleculei de anticorp (a se vedea, *de exemplu*, Publicațiile internaționale nr. WO 86/05807 și WO 89/01036; și Brevetul U.S. nr. 5,122,464) și regiunile variabile ale anticorpului pot fi clonate într-un astfel de vector pentru exprimarea întregului lanț greu, a întregului lanț ușor sau a ambelor lanțuri greu și ușor.

Un vector de exprimare poate fi transferat într-o celulă (*de exemplu*, celula gazdă) prin tehnici convenționale și celulele rezultate pot fi apoi cultivate prin tehnici convenționale pentru a produce un anticorp descris aici sau un fragment al acestuia. Astfel, sunt furnizate aici celule gazdă care conțin o polinucleotidă care codifică un anticorp descris aici sau fragmente ale acestuia, sau un lanț greu sau ușor al acestuia, sau un fragment al acestuia, sau un anticorp cu un singur lanț descris aici, legat operațional la un promotor pentru exprimarea unor astfel de secvențe în celula gazdă. În anumite variante de realizare, pentru exprimarea anticorpilor cu lanț dublu, vectorii care codifică atât lanțul greu cât și cel ușor, individual, pot fi co-exprimați în celula gazdă pentru exprimarea întregii molecule de imunoglobulină, așa cum este detaliat mai jos. În anumite variante de realizare, o celulă gazdă conține un vector care cuprinde o polinucleotidă care codifică atât lanțul greu, cât și lanțul ușor al unui anticorp descris aici, sau un fragment al acestuia. În variante de realizare specifice, o celulă gazdă conține doi vectori diferiți, un prim vector care cuprinde o polinucleotidă care codifică un lanț greu al unui anticorp descris aici, și un al doilea vector care cuprinde o polinucleotidă care codifică un lanț ușor unui anticorp descris aici. În alte variante de realizare, o primă celulă gazdă cuprinde un prim vector care cuprinde o polinucleotidă

care codifică un lanț greu al unui anticorp descris aici, și o a doua celulă gazdă care cuprinde un al doilea vector care cuprinde o polinucleotidă care codifică un lanț ușor al unui anticorp descris aici. În variante de realizare specifice, un lanț greu exprimat de o primă celulă asociată cu un lanț ușor al unei a doua celule pentru a forma un anticorp anti-CTLA-4 descris aici sau un fragment al acestuia de legare la antigen. În anumite variante de realizare, este furnizată aici o populație de celule gazdă care cuprinde o astfel de primă celulă gazdă și o astfel de a doua celulă gazdă.

Într-o variantă de realizare particulară, este furnizată aici o populație de vectori care cuprinde un prim vector care cuprinde o polinucleotidă care codifică un lanț ușor al unui anticorp anti-CTLA-4 descris aici și un al doilea vector care cuprinde o polinucleotidă care codifică un lanț greu al unui anticorp anti-CTLA-4 descris aici.

O varietate de sisteme de vectori de exprimare a unei gazde poate fi utilizată pentru a exprima moleculele de anticorp descrise aici (a se vedea, *de exemplu*, Brevet U.S. nr. 5,807,715). Astfel de sisteme de exprimare a gazdei reprezintă vehicule prin care secvențele de codificare de interes pot fi produse și ulterior purificate, dar reprezintă și celule care pot, atunci când sunt transformate sau transfectate cu secvențele de codificare de nucleotide adecvate, să exprime o moleculă de anticorp descrisă aici *in situ*. Acestea includ, dar nu se limitează la microorganisme, cum ar fi bacteriile (*de exemplu*, *E. coli* și *B. subtilis*) transformate cu ADN bacteriofag recombinant, ADN plasmidic sau vectori de expresie a ADN-ului cosmidic care conțin secvențe codificatoare de anticorpi; drojdii (*de exemplu*, *Saccharomyces Pichia*) transformată cu vectori recombinanți de expresie a drojdiei care conțin secvențe codificatoare de anticorpi; sisteme de celule de insecte infectate cu vectori recombinanți de expresie a virusurilor (*de exemplu*, baculovirus) care conțin secvențe codificatoare de anticorpi; sisteme de celule vegetale (*de exemplu*, alge verzi, cum ar fi *Chlamydomonas reinhardtii*) infectate cu vectori recombinanți de expresie a virusurilor (*de ex*, virusul mozaicului conopidei, CaMV; virusul mozaicului tutunului, TMV) sau transformate cu vectori de expresie plasmidică recombinantă (*de exemplu*, plasmid Ti) care conțin secvențe codificatoare de anticorpi; sau sisteme de celule de mamifere (*de exemplu*, COS (*de exemplu*, COS1 sau COS), celule CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NS0, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa, și NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20 și BMT10) care adăpostesc

construcții de expresie recombinante care conțin promotori derivați din genomul celulelor de mamifere (*de exemplu*, promotorul metalotioneinei) sau de la virusuri de mamifere (*de exemplu*, promotorul tardiv al adenovirusului; promotorul virusului vaccinia 7.5K). Într-o variantă de realizare specifică, celulele pentru exprimarea anticorpilor descriși aici sau un fragment al acestora de legare la antigen sunt celule CHO, de exemplu celule din CHO GS Sistem™ (Lonza). Într-o variantă de realizare particulară, celulele pentru exprimarea anticorpilor descrise aici sunt celule umane, de exemplu, linii celulare umane. Într-o variantă de realizare specifică, un vector de exprimare de mamifer este pOptiVEC™ sau pcDNA3.3. Într-o variantă de realizare particulară, celule bacteriene cum ar fi *Escherichia coli*, sau celule eucariote (*de exemplu*, celule de mamifere), în special pentru exprimarea unei molecule întregi de anticorp recombinant, sunt utilizate pentru exprimarea unei molecule de anticorp recombinant. De exemplu, celule de mamifere cum ar fi celule ovariene de hamster chinezesc (CHO), în combinație cu un vector, cum ar fi elementul intermediar principal promotor al genei timpurii a citomegalovirusului uman, este un sistem eficient de exprimare pentru anticorpi (Foecking MK & Hofstetter H (1986) *Gene* 45: 101-5; și Cockett MI și colab., (1990) *Biotechnology* 8(7): 662-7). În anumite variante de realizare, anticorpii descriși aici sunt produși de celule CHO sau celule NS0. Într-o variantă de realizare specifică, exprimarea secvențelor de nucleotide care codifică anticorpii descriși aici care leagă în mod specific CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) este reglată de un promotor constitutiv, un promotor inductibil sau un promotor specific de țesut.

În sistemele bacteriene, o serie de vectori de exprimare pot fi selectați în mod avantajos în funcție de utilizarea intenționată a moleculei de anticorp care este exprimată. De exemplu, când urmează să fie produsă o cantitate mare dintr-un astfel de anticorp, pentru generarea de compoziții farmaceutice ale unei molecule de anticorp, pot fi de dorit vectori care direcționează exprimarea unor niveluri ridicate de produși proteici de fuziune care sunt purificați ușor. Astfel de vectori includ, dar nu se limitează la, vectorul de exprimare a *E. coli* pUR278 (Ruether U & Mueller-Hill B (1983) *EMBO J* 2: 1791-1794), în care secvența de codificare a anticorpului poate fi legată individual în vector în cadru cu regiunea de codificare lac Z astfel încât să fie produsă o proteină de fuziune; vectori pIN (Inouye S & Inouye M (1985) *Nuc Acids Res* 13: 3101-3109; Van Heeke G & Schuster SM (1989) *J Biol Chem* 24: 5503-5509); și altele

asemenea. De exemplu, vectorii pGEX pot fi de asemenea utilizați pentru a exprima polipeptide străine ca proteine de fuziune cu glutathion 5-transferază (GST). În general, astfel de proteine de fuziune sunt solubile și pot fi purificate cu ușurință din celule lizate prin adsorbție și legarea la bile de agaroză cu matrice de glutathion urmată de eluarea în prezență de glutathion liber. Vectorii pGEX sunt proiectați astfel încât să includă trombină sau situsuri de scindare a proteazei cu factor Xa, astfel încât produsul genei țintă clonat să poată fi eliberat din fragmentul GST.

Într-un sistem de insecte, *Autographa californica* virusul poliedrozei nucleare (AcNPV), de exemplu, poate fi utilizat ca vector pentru a exprima gene străine. Virusul crește în celule de *Spodoptera frugiperda*. Secvența de codificare a anticorpului poate fi clonată individual în regiuni neesențiale (de exemplu, gena poliedrinei) ale virusului și plasată sub controlul unui promotor AcNPV (de exemplu, promotorul poliedrinei).

În celulele gazdă de mamifere, pot fi utilizate o serie de sisteme de exprimare pe bază de virus. În cazurile în care un adenovirus se utilizează ca vector de exprimare, secvența de codificare a anticorpului de interes poate fi legată la un complex de control al transcripției/translației adenovirusului, *de exemplu*, succesiunea de promotor și lider tripartit întârziat. Această genă himerică poate fi apoi inserată în genomul adenovirusului prin recombinare *in vitro* sau *in vivo*. Inserția într-o regiune neesențială a genomului viral (*de exemplu*, regiunea EI sau E3) va avea ca rezultat un virus recombinant care este viabil și capabil să exprime molecula de anticorp în gazdele infectate (*de exemplu*, a se vedea Logan J & Shenk T (1984) PNAS 81(12): 3655-9). Semnalele de inițiere specifice pot fi, de asemenea, necesare pentru translația eficientă a secvențelor de codificare a anticorpilor inserați. Aceste semnale includ codonul de inițiere ATG și secvențele adiacente. Mai mult, codonul de inițiere trebuie să fie în fază cu cadrul de citire al secvenței de codare dorite pentru a asigura translația întregului insert. Aceste semnale de control translaționale exogene și codoni de inițiere pot fi de o diversitate de origini, atât naturale, cât și sintetice. Eficiența exprimării poate fi îmbunătățită prin includerea unor elemente adecvate de amplificare a transcripției, terminatori de transcripție, *etc.* (a se vedea, *de exemplu*, Bitter G și colab., (1987) Methods Enzymol. 153: 516-544).

În plus, poate fi aleasă o tulpină de celulă gazdă care modulează exprimarea

secvențelor inserate sau modifică și procesează produsul genic în modul specific dorit. Astfel de modificări (*de exemplu*, glicozilare) și procesarea (*de exemplu*, clivaj) al produselor proteice poate fi important pentru funcția proteinei. Diferitele celule gazdă au mecanisme caracteristice și specifice pentru procesarea și modificarea post-translațională a proteinelor și a produselor genetice. Pot fi alese linii de celule sau sisteme gazdă adecvate pentru a asigura modificarea și procesarea corectă a proteinei străine exprimate. În acest scop, pot fi utilizate celule gazdă eucariote care posedă mecanismul celular pentru procesarea adecvată a transcriptului primar, glicozilare și fosforilare a produsului genic. Astfel de celule gazdă de mamifere includ dar nu sunt limitate la celule CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O și T47D, NS0 (o linie celulară de mielom murin care nu produce endogen orice lanțuri de imunoglobuline), CRL7030, COS (*de exemplu*, COS1 sau COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R1.1, B-W, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 și HsS78Bst. În anumite variante de realizare, anticorpii anti-CTLA-4 descriși aici sunt produși în celule de mamifere, cum ar fi celulele CHO.

Anticorpii descriși aici sau fragmentele de legare la antigen ale acestora pot avea un conținut redus de fucoză sau pot fi fără un conținut de fucoză. Astfel de anticorpi pot fi produși folosind tehnici cunoscute unui specialist în domeniu. De exemplu, anticorpii pot fi exprimați în celule deficitare sau lipsite de capacitatea de a fucozila. Într-un exemplu specific, liniile celulare cu un knockout al ambelor alele ale α 1,6-fucoziltransferazei pot fi utilizate pentru a produce anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen cu conținut redus de fucoză. Sistemul Potelligent® (Lonza) este un exemplu de astfel de sistem care poate fi utilizat pentru a produce anticorpi sau fragmente ale acestora de legare la antigen cu un conținut redus de fucoză.

Pentru producția pe termen lung, cu randament ridicat de proteine recombinante, pot fi generate celule de exprimare stabilă. De exemplu, pot fi modificate prin inginerie liniile celulare care exprimă stabil un anticorp anti-CTLA-4 descris aici sau un fragment de legare la antigen al acestuia. O celulă furnizată aici poate exprima stabil un lanț ușor/o regiune variabilă de lanț ușor/ și un lanț greu/o regiune variabilă de lanț greu care se asociază pentru a forma un anticorp descris aici sau un fragment de legare la antigen al acestuia.

În anumite aspecte, în loc să se utilizeze vectori de exprimare care conțin origini virale de replicare, celulele gazdă pot fi transformate cu ADN controlat de elementele adecvate de control a exprimării (*de exemplu*, promotor, amplificator, secvențe, terminatori de transcripție, situsuri de poliadenilare, *etc.*), și un marker selectabil. După introducerea ADN-ului/polinucleotidei străine, celulele modificate prin inginerie pot fi lăsate să crească timp de 1-2 zile într-un mediu îmbogățit și apoi sunt trecute pe un mediu selectiv. Markerul selectabil din plasmida recombinantă conferă rezistență la selecție și le permite celulelor să integreze stabil plasmida în cromozomii lor și să crească pentru a forma focare care, la rândul lor, pot fi clonate și extinse în linii celulare. Această metodă poate fi utilizată avantajos pentru a modifica prin inginerie linii celulare care exprimă un anticorp anti-CTLA-4 descris aici sau un fragment al acestuia. Astfel de linii celulare modificate prin inginerie pot fi deosebit de utile în screening-ul și evaluarea compozițiilor care interacționează direct sau indirect cu molecula de anticorp.

Pot fi utilizate o serie de sisteme de selecție, incluzând, dar fără a se limita la, timidin kinaza virusului herpes simplex (Wigler M și colab., (1977) Cell 11(1): 223-32), hipoxantinganin fosforiboziltransferaza (Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS 48(12): 2026-2034) și adenin fosforiboziltransferaza (Lowy I și colab., (1980) Cell 22(3): 817-23) gene din celule tk-, hgp^rt- sau respectiv apr^r-. De asemenea, rezistența la antimetaboliți poate fi utilizată ca bază de selecție pentru următoarele gene: *dhfr*, care conferă rezistență la metotrexat (Wigler M și colab., (1980) PNAS 77(6): 3567-70; O'Hare K și colab., (1981) PNAS 78: 1527-31); *gpt*, care conferă rezistență la acidul micofenolic (Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-6); neo, care conferă rezistență la aminoglicozida G-418 (Wu GY & Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596; Mulligan RC (1993) Science 260: 926-932; și Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217; Nabel GJ & Felgner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-5); și *higro*, care conferă rezistență la higromicină (Santerre RF și colab., (1984) Gene 30(1-3): 147-56). Metodele cunoscute de regulă în domeniul tehnologiei ADN recombinant pot fi aplicate conform rutinei pentru a selecta clona recombinată dorită și astfel de metode sunt descrise, de exemplu, în Ausubel FM și colab., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, Gene Transfer and Expression, A

Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); și în Capitolele 12 și 13, Dracopoli NC și colab., (eds.), Current Protocols in Uman Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbère-Garapin F și colab., (1981) J Mol Biol 150: 1-14.

Nivelurile de exprimare ale unei molecule de anticorp pot fi crescute prin amplificarea vectorului (pentru o trecere în revistă, a se vedea Bebbington CR & Hentschel CCG, Use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)). Când un marker din sistemul vectorial care exprimă anticorpul este amplificabil, creșterea nivelului de inhibitor prezent în cultura celulei gazdă va crește numărul de copii ale genei marker. Deoarece regiunea amplificată este asociată cu gena anticorpului, producția de anticorp va crește de asemenea (Crouse GF și colab., (1983) Mol Cell Biol 3: 257-66).

Celula gazdă poate fi co-transfectată cu doi sau mai mulți vectori de exprimare descriși aici, primul vector care codifică o polipeptidă derivată din lanțul greu și al doilea vector care codifică o polipeptidă derivată din lanțul ușor. Cei doi vectori pot conține markeri selectabili identici care permit exprimarea egală a polipeptidelor de lanț greu și ușor. Celulele gazdă pot fi co-transfectate cu unele cantități diferite din cei doi sau mai mulți vectori de exprimare. De exemplu, celulele gazdă pot fi transfectate cu oricare dintre următoarele rapoarte între primul vector de exprimare și al doilea vector de exprimare: 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, sau 1:50.

Alternativ, poate fi utilizat un singur vector care codifică și este capabil să exprime atât polipeptide de lanț greu, cât și de lanț ușor. În astfel de situații, lanțul ușor trebuie plasat înaintea lanțului greu pentru a evita un exces de lanț greu liber de toxicitate (Proudfoot NJ (1986) Nature 322: 562-565; și Köhler G (1980) PNAS 77: 2197-2199). Secvențele de codificare pentru lanțurile greu și ușor pot cuprinde ADNc sau ADN genomic. Vectorul de exprimare poate fi monocistronic sau multicistronic. Un construct de acid nucleic multicistronic poate codifica 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sau mai multe, sau în intervalul 2-5, 5-10 sau 10-20 gene/secvențe de nucleotide. De exemplu, un construct de acid nucleic bicistronic poate cuprinde în următoarea ordine un promotor, o primă genă (*de exemplu*, lanț greu al unui anticorp descris aici), și o a

doua genă și (*de exemplu*, un lanț ușor al unui anticorp descris aici). Într-un astfel de vector de exprimare, transcripția ambelor gene poate fi condusă de promotor, în timp ce translația ARNm de la prima genă poate fi printr-un mecanism de scanare dependent de capac, și translația ARNm de la a doua genă poate fi prin un mecanism independent de capac, *de exemplu*, printr-un IRES.

Odată ce o moleculă de anticorp descrisă aici a fost produsă prin exprimare recombinantă, aceasta poate fi purificată prin orice metodă cunoscută în domeniu pentru purificarea unei molecule de imunoglobulină, de exemplu, prin cromatografie (*de exemplu*, schimb ionic, afinitate, în special prin afinitatea pentru antigenul specific după proteina A și cromatografia pe coloană de dimensionare), centrifugare, solubilitate diferențială sau prin orice altă tehnică standard pentru purificarea proteinelor. Mai mult, anticorpii descriși aici pot fi fuzionați cu secvențe de polipeptide heteroloage descrise aici sau cunoscute altfel în domeniu pentru a facilita purificarea.

În variante de realizare specifice, un anticorp descris aici este izolat sau purificat. În general, un anticorp izolat este unul care este substanțial liber de alți anticorpi cu specificități antigenice diferite de anticorpul izolat. De exemplu, într-o variantă de realizare particulară, un preparat al unui anticorp descris aici este substanțial liber de material celular și/sau precursori chimici. Limbajul "substanțial liber de material celular" include preparate ale unui anticorp în care anticorpul este separat de componentele celulare ale celulelor din care este izolat sau produs recombinant. Astfel, un anticorp care este substanțial liber de material celular include preparate de anticorp având mai puțin de aproximativ 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, sau 0,1% (ca greutate uscată) de proteină heteroloagă (denumită aici și "proteină contaminantă") și/sau variante ale unui anticorp, de exemplu, diferite forme modificate post-translaționale ale unui anticorp sau alte versiuni diferite ale unui anticorp (de exemplu, fragmente de anticorp). Când anticorpul este produs recombinant, este, de asemenea, în general, substanțial liber de mediu de cultură, *adică*, mediul de cultură reprezintă mai puțin de aproximativ 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5%, sau 0,1% din volumul preparatului proteic. Când anticorpul este produs prin sinteză chimică, este în general lipsit de precursori chimici sau alte substanțe chimice, *adică*, este separat de precursori chimici sau alte substanțe chimice care sunt implicate în sinteza proteinei. În consecință, astfel de preparate ale anticorpului au mai puțin de aproximativ 30%, 20%, 10%, sau 5% (în

greutate uscată) de precursori chimici sau compuși alții decât anticorpul de interes. Într-o variantă de realizare specifică, anticorpii descriși aici sunt izolați sau purificați.

Anticorpi sau fragmente ale acestora care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) poate fi produs prin orice metodă cunoscută în domeniu pentru sinteza anticorpilor, de exemplu, prin sinteză chimică sau prin tehnici de exprimare recombinată. Metodele descrise aici utilizează, dacă nu se indică altfel, tehnici convenționale în biologia moleculară, microbiologie, analiză genetică, ADN recombinant, chimie organică, biochimie, PCR, sinteza și modificarea oligonucleotidelor, hibridizarea acidului nucleic și domenii înrudite în domeniu. Aceste tehnici sunt descrise, de exemplu, în referințele citate aici și sunt pe deplin explicate în literatură. A se vedea, *de exemplu*, Maniatis T și colab., (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J și colab., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J și colab., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM și colab., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 și actualizările anuale); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 și actualizările anuale) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides și Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B și colab., (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Un anticorp descris aici poate fi un anticorp (*de exemplu*, anticorp recombinant) preparat, exprimat, creat sau izolat prin orice mijloace care implică crearea, *de exemplu*, prin sinteză, inginerie genetică a secvențelor de ADN. Un astfel de anticorp poate cuprinde secvențe (*de exemplu*, secvențe de ADN sau secvențe de aminoacizi) secvențe de ADN sau secvențe de aminoacizi) care nu există natural în repertoriul liniei germinale de anticorpi a unui animal sau mamifer (*de exemplu*, uman) *in vivo*.

Într-un aspect, este furnizată aici o metodă de producere a unui anticorp care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) cultivarea unei celule sau celule gazdă descrise aici. Într-un anumit aspect, este furnizată aici o metodă de producere a unui anticorp care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-

4 uman) care cuprinde exprimarea (*de exemplu*, exprimând recombinant) anticorpul sau fragmentul de legare la antigen al acestuia folosind o celulă sau celulă gazdă descrisă aici (*de exemplu*, o celulă sau o celulă gazdă care cuprinde polinucleotide care codifică un anticorp descris aici). Celula poate fi o celulă izolată. Este posibil ca polinucleotidele exogene să fi fost introduse în celulă. Metoda poate cuprinde în plus etapa de purificare a anticorpului sau a fragmentului de legare la antigen al acestuia obținut din celulă sau celula gazdă. De preferință, metoda este efectuată *in vitro*.

Metodele de producere ale anticorpilor policlonali sunt cunoscute în domeniu (a se vedea, de exemplu, Capitolul 11 în: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) Ed a-5-a, Ausubel FM și colab., ed., John Wiley and Sons, New York).

Anticorpii monoclonali pot fi preparați utilizând o mare varietate de tehnici cunoscute în domeniu, incluzând utilizarea hibridomului, a tehnologiilor recombinante și de prezentare a fagilor sau o combinație a acestora. De exemplu, anticorpii monoclonali pot fi produși folosind tehnici de hibridom, inclusiv cele cunoscute în domeniu și predate, de exemplu, în Harlow E & Lane D, *Anticorpi: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, ed. a-2-a 1988); Hammerling GJ și colab., în: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y, 1981). Termenul "anticorp monoclonal" așa cum se utilizează aici nu este limitat la anticorpi produși prin tehnologia hibridomului. De exemplu, anticorpii monoclonali pot fi produși recombinant din celule gazdă care exprimă exogen un anticorp descris aici sau un fragment al acestuia, de exemplu, un lanț ușor și/sau lanț greu al unui astfel de anticorp.

În variante de realizare specifice, un "anticorp monoclonal", așa cum se utilizează aici, este un anticorp produs de o singură celulă (*de exemplu*, hibridom sau celulă gazdă care produce un anticorp recombinant), în care anticorpul se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) așa cum a fost determinat, *de exemplu*, prin ELISA sau un alt test de legare la antigen sau de legare competitivă cunoscut în domeniu sau din exemplele furnizate aici. În variante de realizare particularizate, un anticorp monoclonal poate fi un anticorp himeric sau un anticorp umanizat. În anumite variante de realizare, un anticorp monoclonal este un anticorp monovalent sau multivalent (*de exemplu*, anticorp bivalent). În variante de realizare

particularizate, un anticorp monoclonal este un anticorp monospecific sau multispecific (*de exemplu*, anticorp bispecific). Anticorpul monoclonal descriși aici pot fi, de exemplu, produși prin metoda hibridomului așa cum este descris în Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495, sau pot fi izolați, *de exemplu*, din biblioteci de fagi folosind, de exemplu, tehnicile descrise aici. Alte metode pentru prepararea liniilor celulare clonale și a anticorpilor monoclonali exprimați prin acestea sunt bine cunoscute în domeniu (a se vedea, de exemplu, Capitolul 11 din: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) Ed a-5-a, Ausubel FM și colab., *supra*).

Metodele de producere și screening pentru anticorpul specific utilizând tehnologia hibridomului sunt de rutină și bine cunoscute în domeniu. De exemplu, în metoda hibridomului, un șoarece sau alt animal gazdă adecvat, cum ar fi o oaie, capră, iepure, șobolan, hamster sau maimuță macac, este imunizat pentru a produce limfocite care produc sau sunt capabile să producă anticorpi care se vor lega specific la proteina (*de exemplu*, CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman)) utilizată pentru imunizare. Alternativ, limfocitele pot fi imunizate *in vitro*. Limfocitele sunt apoi fuzionate cu celulele de mielom folosind un agent de fuziune adecvat, cum ar fi polietilen glicol, pentru a forma o celulă de hibridom (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pag. 59-103 (Academic Press, 1986)). În plus, pentru a imuniza un animal poate fi utilizată o tehnică RIMMS (imunizare repetitivă la mai multe situsuri) (Kilpatrick KE și colab., (1997) *Hybridoma* 16:381-9).

În unele dezvoltări, șoarecii (sau alte animale, cum ar fi șobolani, maimuțe, măgari, porci, oi, hamsteri sau câini) pot fi imunizați cu un antigen (*de exemplu*, CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman)) și odată ce este detectat un răspuns imun, *de exemplu*, anticorpul specific pentru antigen sunt detectați în serul de șoarece, splina de șoarece este recoltată și splenocitele sunt izolate. Splenocitele sunt apoi fuzionate prin tehnici bine cunoscute cu orice celule de mielom adecvate, de exemplu celule din linia celulară SP20 disponibilă de la American Type Culture Collection (ATCC®) (Manassas, VA), pentru a forma hibridoame. Hibridoamele sunt selectate și clonate prin diluție limitată. În anumite variante de realizare, ganglionii limfatici ai șoarecilor imunizați sunt recoltați și fuzionați cu celule de mielom NS0.

Celulele de hibridom astfel preparate sunt însămânțate și crescute într-un

mediu de cultură adecvat care conține, de preferință, una sau mai multe substanțe care inhibă creșterea sau supraviețuirea celulelor parentale de mielom nefuzionate. De exemplu, dacă celulele de mielom parental nu au enzima hipoxantin guanin fosforibozil transferaza (HGPRT sau HPRT), mediul de cultură pentru hibridoame va include tipic hipoxantina, aminopterina și timidina (mediu HAT), substanțe care împiedică creșterea celulelor deficiente de HGPRT.

Pot fi utilizate celule de mielom care fuzionează eficient, susțin producția stabilă de anticorpi la nivel înalt de către celulele producătoare de anticorpi selectate și sunt sensibile la un mediu cum ar fi mediul HAT. Printre aceste linii celulare de mielom se numără liniile de mielom murin, cum ar fi linia celulară NS0 sau cele derivate din tumorile de șoarece MOPC-21 și MPC-11 disponibile de la Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA, și celule SP-2 sau X63-Ag8.653 disponibile de la American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA. Liniile celulare de mielom uman și heteromielom șoarece-uman au fost, de asemenea, descrise pentru producerea de anticorpi monoclonali umani (Kozbor D (1984) J Immunol 133: 3001-5; Brodeur și colab., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pag. 51-63 (Marcel Dekker, Inc, New York, 1987)).

Mediul de cultură în care cresc celulele hibridom este testat în ceea ce privește producerea de anticorpi monoclonali direcționați împotriva CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman). Specificitatea de legare a anticorpilor monoclonali produși de celulele hibridom este determinată prin metode cunoscute în domeniu, de exemplu, imunoprecipitarea sau printr-un test de legare *in vitro* cum ar fi un radioimunotest (RIA) sau test imunoabsorbant legat de enzime (ELISA).

După ce sunt identificate celulele hibridom care produc anticorpi cu specificitatea, afinitatea și/sau activitatea dorită, clonele pot fi subclonate prin proceduri de limitare a diluției și crescute prin metode standard (Goding JW (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, *supra*). Mediile de cultură adecvate pentru acest scop includ, de exemplu, mediu D-MEM sau RPMI 1640. În plus, celulele hibridom pot fi crescute *in vivo* ca tumori ascitice într-un animal.

Anticorpii monoclonali secretați de subclone sunt separați după cum este

adecvat de mediul de cultură, fluidul de ascită sau ser prin proceduri convenționale de purificare a imunoglobulinei, cum ar fi, de exemplu, proteina A-Sepharose, cromatografie cu hidroxilapatită, electroforeză pe gel, dializă sau cromatografia de afinitate.

Anticorpul descriși aici includ fragmente de anticorpi care recunosc specific CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) și pot fi generați prin orice tehnică cunoscută specialiștilor în domeniu. De exemplu, fragmentele de Fab și $F(ab')_2$ descrise aici pot fi produse prin clivarea proteolitică a moleculelor de imunoglobuline, folosind enzime precum papaina (pentru a produce fragmente Fab) sau pepsina (pentru a produce fragmente $F(ab')_2$). Un fragment de Fab corespunde unuia dintre cele două brațe identice ale unei molecule de anticorp și conține lanțul ușor complet asociat cu domeniile VH și CH1 ale lanțului greu. Un fragment de $F(ab')_2$ conține cele două brațe de legare a antigenului ale unei molecule de anticorp legate prin legături disulfurice în regiunea balama.

Mai mult, anticorpul descriși aici sau fragmente de legare la antigen ale acestora pot fi, de asemenea, generați utilizând diferite metode de prezentare a fagilor cunoscute în domeniu. În metodele de prezentare a fagilor, domeniile de anticorpi funcționali sunt afișate pe suprafața particulelor de fagi care poartă secvențele de polinucleotide care le codifică. În special, secvențele de ADN care codifică domeniile VH și VL sunt amplificate din biblioteci de ADNc animale (*de exemplu*, biblioteci de ADNc umane sau murine ale țesuturilor afectate). ADN-ul care codifică domeniile VH și VL este recombinat împreună cu un linker scFv prin PCR și clonat într-un vector fagemid. Vectorul este electroporat în *E. coli* și *E. coli* este infectat cu fagul helper. Fagii utilizați în aceste metode sunt tipic fagi filamentoși incluzând fd și M13, și domeniile VH și VL sunt fuzionate tipic prin recombinare fie cu gena III, fie cu gena VIII. Fagul care exprimă un domeniu de legare la antigen care se leagă la un anumit antigen poate fi selectat sau identificat cu antigen, *de exemplu*, folosind un antigen etichetat sau un antigen legat sau capturat pe o suprafață solidă sau pe mărgel. Exemple de metode de prezentare a fagilor care pot fi utilizate pentru a produce anticorpul descriși aici le includ pe cele dezvăluite în Brinkman U și colab., (1995) J Immunol Methods 182: 41-50; Ames RS și colab., (1995) J Immunol Methods 184: 177-186; Kettleborough CA și colab., (1994) Eur J Immunol 24: 952-958; Persic L și

colab., (1997) *Gene* 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) *Advan Immunol* 57: 191-280; Cererea PCT nr. PCT/GB91/001134; Publicațiile Internaționale nr. WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401, și WO 97/13844; și Brevetele U.S. nr. 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 și 5,969,108.

Așa cum este descris în referințele de mai sus, după selecția fagului, regiunile care codifică anticorpii din fag pot fi izolate și utilizate pentru a genera anticorpi integrali, inclusiv anticorpi umani, sau orice alt fragment dorit de legare la antigen și exprimat în orice gazdă dorită, inclusiv celule de mamifere, celule de insecte, celule de plante, drojdie și bacterii, *de exemplu*, așa cum este descris mai jos. Tehnici de producere recombinantă a fragmentelor de anticorpi cum ar fi fragmentele Fab, Fab' și $F(ab')_2$ pot fi, de asemenea, utilizate folosind metode cunoscute în domeniu, cum ar fi cele descrise în Publicația PCT nr. WO 92/22324; Mullinax RL și colab., (1992) *BioTechniques* 12(6): 864-9; Sawai H și colab., (1995) *Am J Reprod Immunol* 34: 26-34; și Better M și colab., (1988) *Science* 240: 1041-1043.

Pentru a genera anticorpi integrali, primeri PCR care includ secvențe de nucleotide de VH sau VL, un situs de restricție și o secvență de flancare pentru a proteja situsul de restricție pot fi utilizați pentru a amplifica secvențele de VH sau VL dintr-un șablon, *de exemplu*, clone scFv. Utilizând tehnici de clonare cunoscute specialiștilor în domeniu, domeniile de VH amplificate prin PCR pot fi clonate în vectori care exprimă o regiune constantă de VH, și domeniile VL amplificate prin PCR pot fi clonate în vectori care exprimă o regiune constantă de VL, *de exemplu*, regiunile constante kappa sau lambda umane. Domeniile VH și VL pot fi, de asemenea, clonate într-un vector care exprimă regiunile constante necesare. Vectorii de conversie a lanțului greu și vectorii de conversie a lanțului ușor sunt apoi co-transfectați în linii celulare pentru a genera linii celulare stabile sau tranzitorii care exprimă anticorpi cu lungime completă, *de exemplu*, IgG, utilizând tehnici cunoscute specialiștilor în domeniu.

Un anticorp himeric este o moleculă în care diferite porțiuni ale anticorpului sunt derivate din diferite molecule de imunoglobulină. De exemplu, un anticorp himeric

poate conține o regiune variabilă a unui anticorp monoclonal de șoarece sau șobolan fuzionat cu o regiune constantă a unui anticorp uman. Metode de producere a anticorpilor himerici sunt cunoscute în domeniu. A se vedea, *de exemplu*, Morrison SL (1985) Science 229: 1202-7; Oi VT & Morrison SL (1986) BioTechniques 4: 214-221; Gillies SD și colab., (1989) J Immunol Methods 125: 191-202; și Brevetele U.S. nr. 5,807,715, 4,816,567, 4,816,397, și 6,331,415.

Un anticorp umanizat este capabil să se lege la un antigen predeterminat și care cuprinde o regiune cadru având substanțial secvența de aminoacizi a unei imunoglobuline umane și CDR-uri având substanțial secvența de aminoacizi a unei imunoglobuline non-umane (*de exemplu*, o imunoglobulină murină). În unele variante de realizare particularizate, un anticorp umanizat cuprinde, de asemenea, cel puțin o porțiune dintr-o regiune constantă a imunoglobulinei (Fc), tipic cea a unei imunoglobuline umane. Anticorpul poate include, de asemenea, regiunile CH1, balama, CH2, CH3 și CH4 ale lanțului greu. Un anticorp umanizat poate fi selectat din orice clasă de imunoglobuline, inclusiv IgM, IgG, IgD, IgA și IgE, și orice izotip, inclusiv IgG₁, IgG₂, IgG₃ și IgG₄. Anticorpii umanizați pot fi produși folosind o varietate de tehnici cunoscute în domeniu, incluzând, dar fără a se limita la, grefarea CDR (Brevet European nr. EP 239400; Publicația internațională nr. WO 91/09967; și Brevetele U.S. nr. 5,225,539, 5,530,101, și 5,585,089), furniruirea sau refacerea suprafeței (Brevetele Europene nr. EP 592106 și EP 519596; Padlan EA (1991) Mol Immunol 28(4/5): 489-498; Studnicka GM et al, (1994) Prot Engineering 7(6): 805-814; și Roguska MA și colab., (1994) PNAS 91: 969-973), amestecarea în lanț (Brevet U.S. nr. 5,565,332), și tehnicile dezvăluite în, *de exemplu*, Brev. U.S. Nr. 6,407,213, Brev. U.S. Nr. 5,766,886, Publicația internațională nr. WO 93/17105; Tan P și colab., (2002) J Immunol 169: 1119-25; Caldas C și colab., (2000) Protein Eng. 13(5): 353-60; Morea V și colab., (2000) Methods 20(3): 267-79; Baca M și colab., (1997) J Biol Chem 272(16): 10678-84; Roguska MA și colab., (1996) Protein Eng 9(10): 895 904; Couto JR și colab., (1995) Cancer Res. 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR și colab., (1995) Cancer Res 55(8): 1717-22; Sandhu JS (1994) Gene 150(2): 409-10 și Pedersen JT și colab., (1994) J Mol Biol 235(3): 959-73. A se vedea de asemenea Publicația Cererii U.S. Nr. US 2005/0042664 A1 (Feb. 24, 2005).

Au fost descrise metode de obținere ale unor multispecifici (*de exemplu*,

anticorpi bispecfici), a se vedea, de exemplu, Brevetele U.S. nr. 7,951,917; 7,183,076; 8,227,577; 5,837,242; 5,989,830; 5,869,620; 6,132,992 și 8,586,713.

Anticorpilor cu un singur domeniu, de exemplu, anticorpilor lipsiți de lanțuri ușoare, pot fi produși prin metode bine cunoscute în domeniu. A se vedea Riechmann L & Muyldermans S (1999) J Immunol 231: 25-38; Nuttall SD și colab., (2000) Curr Pharm Biotechnol 1(3): 253-263; Muyldermans S, (2001) J Biotechnol 74(4): 277-302; Brevet U.S. nr. 6,005,079; și Publicațiile Internaționale nr. WO 94/04678, WO 94/25591 și WO 01/44301.

Mai mult, anticorpilor care se leagă în mod specific la un antigen CTLA-4 pot fi utilizați, la rândul lor, pentru a genera anticorpi anti-idiotip care "mimează" un antigen utilizând tehnici bine cunoscute specialiștilor în domeniu. (A se vedea, *de exemplu*, Greenspan NS & Bona CA (1989) FASEB J 7(5): 437-444; și Nissinoff A (1991) J Immunol 147(8): 2429-2438).

Într-o dezvăluire particularizată, un anticorp descris aici, care se leagă la același epitop al CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) ca un anticorp anti-CTLA-4 descris aici, este un anticorp uman sau un fragment de legare la antigen al acestuia. Într-o dezvăluire particulară, un anticorp descris aici, care blochează competitiv (*de exemplu*, într-o manieră dependentă de doză) oricare dintre anticorpilor descriși aici, de a se lega la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman), este un anticorp uman sau un fragment de legare la antigen al acestuia. Anticorpilor umani pot fi produși folosind orice metodă cunoscută în domeniu. De exemplu, pot fi utilizați șoareci transgenici care sunt incapabili să exprime imunoglobuline endogene funcționale, dar care pot exprima gene de imunoglobuline umane. În particular, complexii genici de lanț greu și ușor ai imunoglobulinei umane pot fi introduși aleatoriu sau prin recombinarea omoloagă în celulele stem embrionare de șoarece. Alternativ, regiunea variabilă, regiunea constantă și regiunea diversitate umană pot fi introduse în celulele stem embrionare de șoarece în plus față de genele lanțului greu și ușor uman. Genele de imunoglobulină de lanț greu și ușor de șoarece pot fi făcute să fie nefuncționale separat sau simultan cu introducerea locilor de imunoglobuline umane prin recombinare omoloagă. În special, deleția homozigotă a regiunii J_H previne producerea de anticorpi endogeni. Celulele stem embrionare modificate sunt extinse și microinjectate în blastociste

pentru a produce șoareci himerici. Șoarecii himerici sunt apoi crescuți pentru a produce descendenți homozigoți care exprimă anticorpi umani. Șoarecii transgenici sunt imunizați în mod normal cu un antigen selectat, *de exemplu*, tot sau o porțiune dintr-un antigen (*de exemplu*, CTLA-4). Anticorpii monoclonali direcționați împotriva antigenului pot fi obținuți de la șoarecii transgenici imunizați folosind tehnologia convențională a hibridomului. Transgenele imunoglobulinei umane găzduite de șoarecii transgenici se rearanjează în timpul diferențierii celulelor B și, ulterior, suferă comutarea clasei și mutația somatică. Astfel, folosind o astfel de tehnică, este posibil să se producă anticorpi IgG, IgA, IgM și IgE utili din punct de vedere terapeutic. Pentru o trecere în revistă a acestei tehnologii pentru producerea de anticorpi umani, a se vedea Lonberg N & Huszar D (1995) *Int Rev Immunol* 13:65-93. Pentru o discuție detaliată a acestei tehnologii pentru producerea de anticorpi umani și anticorpi monoclonali umani și protocoale pentru producerea unor astfel de anticorpi, a se vedea, *de exemplu*, Publicațiile Internaționale nr. WO 98/24893, WO 96/34096 și WO 96/33735; și Brevetele U.S. nr. 5,413,923, 5,625,126, 5,633,425, 5,569,825, 5,661,016, 5,545,806, 5,814,318 și 5,939,598. Exemple de șoareci capabili să producă anticorpi umani includ Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; Brevetele U.S. nr. 6,075,181 și 6,150,184), HuAb-Mouse™ (Medarex, Inc./Gen Pharm; Brevetele U.S. nr. 5,545,806 și 5,569, 825), Trans Chromo Mouse™ (Kirin) și KM Mouse™ (Medarex/Kirin).

Anticorpii umani care se leagă în mod specific la CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) pot fi obținuți printr-o varietate de metode cunoscute în domeniu, inclusiv metode de prezentare a fagilor descrise mai sus folosind biblioteci de anticorpi derivate din secvențe de imunoglobuline umane. A se vedea de asemenea și Brevetele U.S. nr. 4,444,887, 4,716,111, și 5,885,793; și Publicațiile internaționale nr. WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, și WO 91/10741.

Anticorpii umani pot fi produși folosind hibridoame șoarece-uman. De exemplu, limfocitele din sângele periferic uman transformate cu virusul Epstein-Barr (EBV) pot fi fuzionate cu celule de mielom de șoarece pentru a produce hibridoame șoarece-uman care secretă anticorpi monoclonali umani, și aceste hibridoame șoarece-uman pot fi analizate pentru a le determina pe cele care secretă anticorpi monoclonali umani care se leagă în mod specific la un antigen țintă (*de exemplu*, CTLA-4 (*de exemplu*,

CTLA-4 uman)). Astfel de metode sunt cunoscute și sunt descrise în domeniu, a se vedea, *de exemplu*, Shinmoto H și colab., (2004) *Cytotechnology* 46: 19-23; Naganawa Y și colab., (2005) *Human Antibodies* 14: 27-31.

5.6 Kituri

De asemenea, sunt furnizate kituri care cuprind unul sau mai mulți anticorpi descriși aici, sau o compoziție farmaceutică sau conjugați ai acestora. Într-o dezvoltare specifică, este furnizat aici un pachet sau un kit farmaceutic care cuprinde unul sau mai multe recipiente umplute cu unul sau mai multe dintre ingredientele compozițiilor farmaceutice descrise aici, cum ar fi unul sau mai mulți dintre anticorpii furnizați aici sau un fragment de legare la antigen al acestuia. În unele dintre dezvoltări, kiturile conțin o compoziție farmaceutică descrisă aici și orice agent profilactic sau terapeutic, cum ar fi cei descriși aici. Într-o anumită dezvoltare, kiturile pot conține un mitogen de celule T, cum ar fi, *de exemplu*, fitohemaglutinină (PHA) și/sau acetat de miristat de forbol (PMA) sau un anticorp de stimulare a complexului TCR, cum ar fi un anticorp anti-CD3 și un anticorp anti-CD28. Opțional asociat cu un astfel de recipient(e) poate fi o notă în forma prescrisă de o agenție guvernamentală care reglementează fabricarea, utilizarea sau vânzarea produselor farmaceutice sau a produselor biologice, notă care reflectă aprobarea agenției, de fabricare, utilizare sau vânzare pentru administrarea umană.

De asemenea, sunt furnizate kituri care pot fi utilizate în metodele de mai sus. Într-o dezvoltare, un kit cuprinde un anticorp descris aici, de preferință un anticorp purificat, într-unul sau mai multe recipiente. Într-o dezvoltare specifică, kiturile descrise aici conțin un antigen CTLA-4 (*de exemplu*, CTLA-4 uman) substanțial izolat ca un martor. Într-o altă dezvoltare specifică, kiturile descrise aici cuprind în plus un anticorp martor care nu reacționează cu un antigen de CTLA-4. Într-o altă dezvoltare specifică, kiturile descrise aici conțin unul sau mai multe elemente pentru detectarea legării unui anticorp la un antigen de CTLA-4 (*de exemplu*, anticorpul poate fi conjugat la un substrat detectabil, cum ar fi un compus fluorescent, un substrat enzimatic, un compus radioactiv sau un compus luminiscent, sau un al doilea anticorp care recunoaște primul anticorp poate fi conjugat la un substrat detectabil). Într-o dezvoltare specifică, un kit furnizat aici poate include un antigen de CTLA-4 produs recombinant sau sintetizat

chimic. Antigenul de CTLA-4 furnizat în kit poate fi, de asemenea, atașat la un suport solid. Într-o dezvoltare mai specifică, mijloacele de detectare din kitul descris mai sus includ un suport solid la care este atașat un antigen de CTLA-4. Un astfel de kit poate include, de asemenea, un anticorp anti-uman etichetat cu reporter neatașat sau anticorp anti-șoarece/șobolan. În această dezvoltare, legarea anticorpului la antigenul de CTLA-4 poate fi detectată prin legarea respectivului anticorp etichetat cu reporter.

O dezvoltare se referă la utilizarea unui kit pentru testarea și/sau detectarea *in vitro* a CTLA-4 uman într-o probă biologică.

6. EXEMPLE

Exemplele din această secțiune (*adică*, Secțiunea 6) sunt oferite cu titlul de ilustrare și nu cu titlul de limitare.

6.1 Exemplul 1: Caracterizarea anticorpilor noi anti-CTLA-4

Acest exemplu descrie caracterizarea anticorpilor care se leagă la CTLA-4 uman. În particular, acest exemplu descrie caracterizarea anticorpilor care se leagă în mod specific la CTLA-4 uman și inhibă funcția lui CTLA-4. Informațiile referitoare la secvență ale regiunilor variabile ale acestor anticorpi sunt furnizate în Tabelul 4. Toți anticorpii au fost exprimați ca anticorpi IgG₁ și analizați prin testele descrise mai jos.

6.1.1 Legarea anticorpilor anti-CTLA-4 la celulele care exprimă CTLA-4

Celulele Jurkat modificate prin inginerie pentru a exprima constitutiv CTLA-4 uman (Promega) au fost utilizate pentru a analiza legarea anticorpilor anti-CTLA-4. Pe scurt, celulele au fost colorate la 5×10^5 celule/godeu utilizând 2 μ g/ml de anticorp într-o placă cu 96 de godeuri timp de 30 de minute la 4°C. Celulele au fost spălate de două ori și incubate timp de 20 de minute la 4°C cu un anticorp secundar IgG anti uman (Thermo Scientific, Cat #31529). Celulele au fost spălate și suspendate în 50 μ l de paraformaldehidă 2% (Alfa Aesar, Cat #43368) preparată în PBS. Datele au fost colectate cu BD FACS Canto II.

Așa cum este ilustrat în Figurile 1A-1G, toți anticorpii anti-CTLA-4 testați s-au legat la celule care exprimă CTLA-4.

6.1.2 Efectul anticorpului anti-CTLA-4 asupra PBMC-urilor umane după stimularea enterotoxinei A stafilococice (SEA)

Activitățile funcționale ale anticorpului anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi) asupra unor PBMC-uri umane primare au fost evaluate în urma stimulării enterotoxinei A stafilococice (SEA). Pe scurt, PBMC-urile crioconservate au fost stimulate cu 100 ng/ml de superantigen SEA (Toxin Technologies, Cat # at101red) în absența sau prezența a 10 µg/ml dintr-un anticorp anti-CTLA-4 sau un izotip de anticorp martor (IgGi) timp de 5 zile la 37°C și 5% CO₂. Concentrațiile de IL-2 din supernatantul culturii au fost analizate prin AlphaLISA (Perkin Elmer, Cat# AL221F).

Anticorpul anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi) a crescut producția de IL-2 în PBMC-urile umane stimulate cu superantigenul SEA (Figura 2).

6.1.3 Efectul anticorpului anti-CTLA-4 asupra liniei celulare reporter IL-2-luciferazei

Apoi, activitățile funcționale ale anticorpului anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi) au fost analizate în continuare utilizând un test raportor de IL-2-luciferază. Pe scurt, o linie de celule T umane (Jurkat) care a exprimat endogen CD3 și CD28 a fost modificată prin inginerie pentru a exprima constitutiv CTLA-4 de suprafață celulară și o genă reporter a luciferazei condusă de un promotor IL-2. Linia celulară reporter Jurkat a fost co-cultivată cu o linie celulară prezentatoare de antigen (Raji) care a exprimat endogen CD80 și CD86 și a fost modificată prin inginerie pentru a exprima un activator de celule T brevetat (Promega). Declanșarea receptorului celulelor T (TCR) (semnalul 1) a fost realizată de activatorul celulei T; și semnalizarea costimulatoare (semnalul 2) a fost furnizată în trans de CD80 și CD86 exprimate pe celule Raji. Semnalizarea TCR în linia de celule T Jurkat a declanșat exprimarea IL-2, conducând la producerea de luciferază, un marker surrogat pentru activarea celulelor T. Co-cultura acestor două linii celulare a avut ca rezultat angajarea co-receptorului inhibitor de CTLA-4 (exprimat pe celulele Jurkat) cu liganzii săi naturali CD80 și CD86 (exprimați pe celulele Raji) inhibând activarea celulelor T, demonstrată de lipsa de exprimare a luciferazei. Această inhibare a fost ameliorată la adăugarea unor concentrații crescânde de anticorpi blocați de anti-CTLA-4. Exprimarea luciferazei a fost cuantificată folosind reactivul Bio-Glo™ și datele rezultate au fost utilizate pentru a

se determina valorile răspunsului (multipli ai creșterii AGEN1884.H3 (IgGi) în comparație cu un anticorp martor de izotip (IgG₁)).

Așa cum este arătat în Figura 3, anticorpul anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi) a eliberat dependent de doză CTLA-4, a mediat inhibarea celulelor T în acest test raportor IL-2-luciferazei.

6.1.4 Efectul anticorpului anti-CTLA-4 asupra liniei celulare reporter a receptorului gamma Fc IIIA

Capacitatea anticorpului anti-CTLA-4 de a co-angaja CTLA-4 și semnaliza *via* activarea receptorilor gamma Fc a fost evaluată utilizând o linie celulară reporter care exprimă receptorul gamma Fc IIIA (FcγRIIIA) (Promega). Pe scurt, celulele Jurkat au fost modificate prin inginerie pentru a exprima constitutiv CTLA-4 uman pe suprafața celulei. Aceste celule țintă au fost co-cultivate cu o linie de celule efectoare (Jurkat) modificate prin inginerie pentru a exprima FcγRIIIA (varianta V158) în amonte de un element de răspuns NFAT (RE) care conduce exprimarea luciferazei de licurici. O doză titrată de AGEN1884.H3 (IgGi) sau un anticorp martor de izotip (IgGi) a fost adăugată la co-cultură și incubată la 37°C peste noapte. Angajarea simultană a AGEN1884.H3 de către linia celulară țintă (legarea la CTLA-4 prin regiunea Fab) și linia de celule efectoare (legarea la FcγRIIIA prin regiunea Fc) declanșează activarea genei reporter NFAT RE și exprimarea luciferazei. A doua zi, la co-cultură a fost adăugat reactivul Bio-Glo (Promega), luminiscenta a fost măsurată cu Cititorul de plăci multimodal EnVision (Perkin Elmer) și au fost înregistrate unitățile de lumină relative (RLU) pentru a calcula valorile răspunsului (multipli de creștere cu AGEN1884.H3 (IgGi) comparativ cu un anticorp martor de izotip (IgGi)).

Când este legat de celulele țintă care exprimă CTLA-4 uman pe suprafața celulei, anticorpul AGEN1884.H3 IgG₁ a activat semnalizarea FcγRIIIA în celulele efectoare (Figura 4).

6.2 Exemplul 2: Caracterizarea anticorpilor anti-CTLA-4 cu diferite regiuni Fc

Acest exemplu analizează impactul interacțiunii receptorului Fc/Fc asupra activității funcționale a anticorpilor anti-CTLA-4. Anticorpul AGEN1884.H3 a fost

exprimat ca anticorpi în care regiunea Fc de IgG₁ cuprinde mutațiile S239D/I332E, S239D/A330L/I332E, sau L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L, numerotate conform sistemului de numerotare EU, și testat prin testele funcționale descrise mai jos. Anticorpul AGEN1884.H3 (IgGi S239D/I332E) cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 24 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27. Anticorpul AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E) cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 25 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27. Anticorpul AGEN1884.H3 (IgGi L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L) cuprinde un lanț greu care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 26 și un lanț ușor care cuprinde secvența de aminoacizi a SECV ID NR: 27. Pentru comparație, AGEN1884 a fost de asemenea exprimat ca un anticorp IgG₁ de tip sălbatic, un anticorp IgG₁ care cuprinde mutații S239D/I332E sau S239D/A330L/I332E, numerotate conform sistemului de numerotare EU, sau un anticorp IgG₁ afucozilat, și testați prin unele teste funcționale.

6.2.1 Legarea anticorpilor anti-CTLA-4 la celulele care exprimă CTLA-4

Legarea anticorpilor anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi S239D/I332E), AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), și AGEN1884.H3 (IgGi L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L) la celule care exprimă CTLA-4 a fost caracterizată similar celor descrise mai sus. Pe scurt, celule Jurkat modificate prin inginerie pentru a exprima CTLA-4 uman (Promega) au fost colorate mai întâi cu 5 μg/ml dintr-un anticorp anti-CTLA-4 sau un izotip de anticorp martor și apoi cu un anticorp secundar IgG anti-uman (Thermo Scientific, Cat #31529). Celulele au fost analizate folosind BD FACS Canto II.

Așa cum este ilustrat în figurile 5A-5D, anticorpul AGEN1884.H3 cu diferite regiuni Fc s-au legat toți de celule care exprimă CTLA-4 uman.

6.2.2 Efectul anticorpului anti-CTLA-4 asupra legării ligandului la CTLA-4 uman

În acest exemplu, a fost testată capacitatea unui anticorp anti-CTLA-4 varianta Fc AGEN1884.H3 (IgGi-S239D/A330E/I332E) de a bloca legarea dintre CTLA-4 uman și liganzii săi, CD80 și CD86.

Pe scurt, proteinele recombinante CD80-Fc și CD86-Fc au fost conjugate la fluorocromul Alexa Fluor 647 (Invitrogen, A20186). Celulele Jurkat au fost transduse cu *trCTLA4* (domeniu intracelular trunchiat) sub controlul promotorului EF1 α , așa cum este descris în Nakaseko și colab. (J Exp Med. 1999 Sep 20; 190(6): 765-774), producând astfel o linie celulară care a exprimat constitutiv CTLA-4 uman pe suprafața celulei. Celulele care exprimă CTLA-4 au fost incubate cu o titrare a dozei de anticorp anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi-S239D/A330E/I332E), un anticorp de referință anti-CTLA-4 sau un anticorp martor de izotip (IgGi). Celulele au fost apoi colorate cu proteină CD80-Fc sau CD86-Fc etichetată fluorescent. După colorare, fluorescența a fost analizată folosind citometrul de flux LSRFortessa (BD Biosciences). Graficele FACS au fost analizate folosind o combinație de software FACS DIVA și WEHI Weasel. Valorile au fost reprezentate grafic folosind software-ul Graphpad Prism.

Așa cum este arătat în Figura 6A, AGEN1884.H3 (IgGi-S239D/A330E/I332E) și anticorpul de referință anti-CTLA-4 au blocat fiecare legarea dintre CTLA-4 și CD80 uman într-o manieră dependentă de doză, în timp ce anticorpul martor de izotip (IgGi) nu a avut efect. Așa cum este arătat în Figura 6B, AGEN1884.H3 (IgGi-S239D/A330E/I332E) și anticorpul de referință anti-CTLA-4 au blocat de asemenea fiecare legarea dintre CTLA-4 și CD86 uman într-o manieră dependentă de doză, în timp ce anticorpul martor de izotip (IgGi) nu a avut efect. Aceste date arată că AGEN1884.H3 (IgGi-S239D/A330E/I332E) funcționează ca un anticorp de blocare a ligandului pentru CTLA-4.

6.2.3 Efectul anticorpilor anti-CTLA-4 asupra PBMC-urilor umane în urma stimulării enterotoxinei A stafilococice (SEA)

În acest exemplu, impactul regiunilor Fc asupra activității funcționale a anticorpilor anti-CTLA-4 a fost analizat utilizând testul de stimulare SEA descris mai sus. Pe scurt, PBMC-urile umane au fost cultivate in vitro cu 100 ng/ml de peptidă SEA (Toxin Technologies, Cat # at101red) în absența sau prezența anticorpilor anti-CTLA-4 cu diferite regiuni Fc sau a unui anticorp martor de izotip. După cinci zile, concentrațiile de IL-2 în supernatantul culturii, un marker al activării celulelor T, au fost măsurate utilizând AlphaLISA (Perkin Elmer, Cat# AL221F).

Așa cum este ilustrat în Figura 7A, cei trei anticorpi AGEN1884.H3 care conțin mutații în regiunile Fc de IgG₁, toți îmbunătățind legarea la FcγRIIIA, au stimulat mai multă secreție de IL-2 decât AGEN1884.H3 cu o regiune Fc de IgG₁ de tip sălbatic.

În studii similare, anticorpul AGEN1884.H3 sau AGEN1884 cu diferite regiuni Fc au fost testați cu testul de stimulare SEA. Introducerea substituițiilor S239D/I332E, S239D/A330L/I332E, sau L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L regiunea Fc a IgG₁ a îmbunătățit semnificativ activitatea funcțională a AGEN1884.H3 (Figura 7B). Similar, AGEN1884 (IgGi S239D/I332E), AGEN1884 (IgGi S239D/A330L/I332E), și AGEN1884 afucozilat (IgGi) au îmbunătățit producția de IL-2 la concentrații substanțial mai mici în comparație cu AGEN1884 cu o regiune Fc de IgG₁ tip sălbatic (Figura 7C).

6.2.4 Efectul anticorpilor anti-CTLA-4 asupra fosforilării ZAP70

În acest exemplu, a fost analizat impactul regiunilor Fc asupra activității funcționale a anticorpilor anti-CTLA-4 în sinapsa celulelor prezentatoare de antigen (APC) utilizând un test care măsoară gradul de fosforilare a proteinei tirozin kinaza ZAP70, care este recrutată la TCR după angajarea TCR, unde devine fosforilată și facilitează evenimentele de semnalizare în aval.

Pe scurt, PBMC-uri umane au fost incubate cu o concentrație suboptimă de peptidă SEA și 10 μg/mL de anticorp martor izotip (IgGi) sau anticorpii anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi), AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau AGEN1884.H3 (IgGi N297A). Celulele au fost apoi incubate la 37°C timp de 0 (pre) 1, 5, 10, 30 sau 60 de minute. La sfârșitul incubării, celulele au fost lizate cu tampon rece 1 x RIPA suplimentat cu un cocktail de inhibitor de fosfatază/protează (Cell Signaling Technologies). După clarificarea supernatantului, concentrația proteinei a fost cuantificată utilizând analiza acidului bichinonic (BCA) (Pierce Biotechnology). Lizatele celulare (20 μg/bandă) au fost preparate în tampon de probă Bolt LDS diluat și încălzit timp de 10 minute la 70°C înainte de a fi încărcat pe geluri Bolt Bis Tris 4-12% (Novex). Proteinele au fost separate în tampon Bolt MOPS 1x (ThermoFisher) și apoi tamponate pe o membrană PVDF. După blocarea cu 5% albumină serică bovină (BSA, 1 oră), probele au fost incubate cu anticorp primar fosfo-ZAP70 (Tyr493)/Syk

(Tyr526) de iepure anti-uman (Cell Signaling Technologies) în tampon de blocare, peste noapte la 4°C. Membranele au fost sondate cu un conjugat HRP secundar de capră anti-iepure și vizualizate cu reactiv SignalFire ECL (Cell Signaling Technology). Imaginile au fost capturate folosind sistemul de imagistică Chemidoc (BioRad). Ca martor, proteina ZAP70 totală a fost evaluată după striparea membranei cu tampon Restore™ PLUS Western Blot Stripping. Analiza densitometrică a fosfo-ZAP70 normalizată la cea a totalului de ZAP70 a fost efectuată utilizând Image J (Wayne Rasband; National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA) și exprimată ca multiplu al modificării în raport cu probele tratate cu izotipul martor care au fost incubate timp de 1 minut.

Așa cum este ilustrat în figurile 8A-8B, în proba de anticorp de izotip martor, fosforilarea ZAP70 a fost crescută tranzitoriu în decurs de zece minute după stimulare și a scăzut rapid fără niveluri detectabile după 15 minute. În schimb, adăugarea de anticorpi anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi) sau AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E) a extins activarea detectabilă a ZAP70 la 30 de minute, cu cea mai pronunțată activitate și abundență relativă observată pentru AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E).

6.2.5 Efectul anticorpilor murini anti-CTLA-4 asupra creșterii tumorii și epuizării celulelor T reglatoare intratumorale într-un model de șoarece

În acest exemplu, impactul regiunilor Fc asupra activităților de epuizare a celulelor T reglatoare antitumorale și intratumorale (Treg) ale anticorpilor anti-CTLA-4 a fost analizat utilizând un model de șoarece pentru cancerul de colon (șoareci purtători de tumoare CT26).

Pe scurt, 5×10^4 celulele tumorale CT26 au fost suspendate în 100 ml PBS și injectate subcutanat la șoareci BALB/cJ femele de 6-8 săptămâni (Jackson Laboratories). După grefarea la un volum tumoral de 50-80mm³, șoarecii au fost tratați cu o singură doză de 100 μg de anticorp murin anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a), o variantă Fc-silențioasă a anticorpului anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A), o variantă Fc a anticorpului anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2aS239D/A330L/I332E), sau un izotip de anticorp

martor (mlgG2a). Secvențele de aminoacizi pentru anticorpii murini testați sunt prezentate în Tabelul 7.

Tabelul 7. Secvențele de aminoacizi ale anticorpilor murini anti-CTLA-4

Descriere	Secvență	SECV ID NR
Lanț greu de anticorp murin anti-CTLA-4 (mlgG2a)	EAKLQESGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDY YMNWVKQSHGKSLEWIGVINPYNGDTSYNQKF KGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYC ARYYGSWFAYWGQGLTVTVSSAKTTAPSVYPL APVCGDGTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQ SITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCP APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVD VSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYN STLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDL APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQV TLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT PVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSV VHEGLHNHHTTKSFSRTPG	49
Lanț greu de anticorp murin anti-CTLA-4 (mlgG2aS239D/A330L/I332E)	EAKLQESGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDY YMNWVKQSHGKSLEWIGVINPYNGDTSYNQKF KGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYC ARYYGSWFAYWGQGLTVTVSSAKTTAPSVYPL APVCGDGTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQ SITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCP APNLLGGPDVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVVVD VSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYN STLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDL LPEERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQ VTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT EPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCS VVHEGLHNHHTTKSFSRTPG	50

Descriere	Secvență	SECV ID NR
Lanț greu de anticorp murin anti-CTLA-4 (mIgG2a-N297A)	EAKLQESGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDY YMNWVKQSHGKSLEWIGVINPYNGDTSYNQKF KGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYC ARYYGSWFAYWGQGTLLTVSSAKTTAPSVYPL APVCGDITGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQ SITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCP APNLLGGPSVFIFFPKIKDVLMISSPIVTCVVVD VSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYA STLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQV TLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTE PVLDSGGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSV VHEGLHNHHTTKSFSRTPG	51
Lanț ușor de anticorp murin anti-CTLA-4 (mIgG2a)	DIVMTQTTLSPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNG NTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDPDRF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQGSHPV YTFGGGTKLEIKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGG ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNS WTDQDSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTC EATHKTSTSPIVKSFNRNEC	52

Într-un prim experiment, șoarecii tratați cu anticorpi au fost apoi măsurați la două săptămâni în ceea ce privește creșterea tumorii. Așa cum este ilustrat în Figura 9A, o variantă Fc a anticorpului anti-CTLA-4 9D9 (prezentat ca mIgG2a-S239D/A330L/I332E) a indus regresia completă la toți șoarecii purtători de tumoare CT26 (opt din cei opt șoareci testați). În schimb, alte variante ale anticorpului 9D9 nu au reușit să obțină aceeași eficacitate: anticorpul 9D9 (mIgG2a) însuși a indus regresii complete la trei din nouă șoareci testați, și varianta Fc-silențioasă a anticorpului 9D9 (mIgG2a-N297A) nu a reușit să inducă regresia la niciunul dintre cei nouă șoareci testați.

Într-un al doilea experiment, șoarecii purtători de tumoare CT26 au fost tratați așa cum a fost descris mai sus și apoi sacrificați la 0, 24, 72 sau 240 de ore după

tratament pentru colectarea țesutului tumoral, ganglionii limfatici de drenaj tumoral și splinelor. Țesuturile colectate au fost evaluate în ceea ce privește expansiunea FoxP3⁺ Treg prin citometrie în flux. Suspensiile de celule unice au fost obținute prin disociere mecanică urmată de filtrare (filtru de celule de 70 μM). Pentru a reduce legarea nespecifică, celulele au fost incubate cu un anticorp de blocare FcγR (Biolegend) în tampon FACS (PBS, 2 mM EDTA, 0,5% BSA, pH 7,2) timp de 15 minute la temperatura ambiantă. Probele au fost apoi spălate de două ori în tampon FACS și colorate pentru o linie de panouri de CD3, CD4, CD8 și CD25, precum și un marker viu/mort fixabil, timp de 30 de minute la 4°C. Pentru delimitarea Treg, probele au fost apoi spălate de două ori, fixate, permeabilizate și apoi incubate cu un anticorp anti-FoxP3 (FJK-16s) timp de 30 de minute la 4°C. Probele au fost analizate folosind un citometru de flux LSRII Fortessa (BD Biosciences). Graficele FACS au fost analizate folosind o combinație de software FACS DIVA și WEHI Weasel. Așa cum este ilustrat în Figura 9B, anticorpul anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a) și varianta Fc a anticorpului anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) au redus fiecare cantitățile de FoxP3⁺ Treg-uri intratumorale în comparație cu izotipul de anticorp martor, cu varianta Fc a anticorpului anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) scăzând cel mai semnificativ cantitatea de FoxP3⁺ Treg-uri intratumorale. Varianta Fc-silențioasă a anticorpului anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A) nu a redus substanțial cantitatea de FoxP3⁺ Treg-uri intratumorale în raport cu izotipul de anticorp martor. Niciunul dintre grupurile de tratament nu a prezentat modificări substanțiale ale cantităților de leucocite CD45⁺ intratumorale sau CD4⁺ non-Treg-uri. Varianta Fc anticorpului anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) a indus cea mai mare creștere a raportului intratumoral CD8/Treg în timp, urmată de anticorpul 9D9 (mIgG2a) și apoi de varianta cu Fc-silențioasă a anticorpului 9D9 (mIgG2a-N297A) și izotipul de anticorp martor (mIgG2a).

Așa cum este ilustrat în Figura 9C, anticorpul anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a), varianta Fc de anticorp anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) și varianta cu Fc-silențioasă a anticorpului anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A) nu a avut niciun efect substanțial asupra cantităților de Treg FoxP3⁺ (TDLN) ale ganglionilor limfatici de drenaj tumoral în comparație cu izotipul de anticorp martor. Similar, așa cum este ilustrat în Figura 9D, anticorpul anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a), varianta Fc de anticorp anti-CTLA-4 anticorpul 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) și varianta cu Fc-

silențioasă a anticorpului anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A) nu a avut un efect substanțial asupra cantităților de Treg-uri FoxP3+ splenice în comparație cu izotipul anticorpului martor.

6.2.6 Efectul anticorpilor murini anti-CTLA-4 în combinație cu un vaccin tumoral asupra creșterii tumorii

În acest exemplu, efectul asupra creșterii tumorii a unei combinații de anticorpi anti-CTLA-4 murini și de vaccin tumoral HPV a fost testat într-un model de tumoare la șoarece singeneic HPV+ TC-1.

Linia celulară TC-1 a fost dezvoltată prin co-transformarea celulelor epiteliale pulmonare primare (C57BL/6) cu oncogene c-Ha-ras și HPV-16 (E6/E7), așa cum este descris în Lin și colab. (1996, Cancer Res. 56(1): 21-26). Pentru implantarea tumorii, 2×10^5 celule TC-1 au fost injectate subcutanat în șoareci femele C57BL/6 cu vârsta de 6-8 săptămâni (Jackson Laboratories). În fiecare din zilele 5, 10 și 15 post-implantare tumorală, șoarecilor li s-au administrat 100 μ g de anticorp anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a), o variantă Fc de anticorp anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2aS239D/A330L/I332E), sau un izotip de anticorp martor (mIgG2a), în combinație cu o doză de vaccin HPV (tumoare HPV+, antigene virale E6/E7) sau fără tratament suplimentar. Fiecare doză de vaccin HPV a conținut 30 μ g de proteină HSP (0,4 nM) complexată cu peptidă de comasat de HPV (1,2 nM) și a fost suplimentată cu 10 μ g de adjuvant QS-21 Stimulon®. După tratament, șoarecii au fost evaluați la două săptămâni în ceea ce privește creșterea tumorii și au fost sacrificați atunci când tumorile au ajuns la 2000 mm³ sau la ulceratie.

Așa cum este ilustrat în Figura 10, eficacitatea antitumorală a anticorpului anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a) și a anticorpului anti-CTLA-4 varianta Fc 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) au prezentat fiecare o îmbunătățire la administrarea în combinație cu vaccin tumoral HPV. Acest efect a fost mai mare pentru anticorpul anti-CTLA-4 varianta Fc (mIgG2a-S239D/A330L/I332E). În special, varianta Fc a anticorpului anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) a indus o scădere suplimentară notabilă a creșterii tumorii TC-1 atunci când a fost combinată cu vaccinul tumoral HPV, comparativ cu cazul în care anticorpul a fost administrat ca un agent unic. Această scădere suplimentară a creșterii tumorii a fost mai mare decât cea

observată pentru combinațiile de anticorp 9D9 (mIgG2a) sau izotip de anticorp martor (mIgG2a) cu vaccinul tumoral HPV.

6.2.7 Caracterizarea populațiilor de celule T extinse și activate

În acest exemplu, populațiile de celule T extinse și activate au fost caracterizate în ceea ce privește exprimarea genelor și metilarea CpG. Pe scurt, celule T reglatoare naturale $CD4^+ CD25^+ FOXP3^+$ sau celule T non-reglatoare $CD4^+ CD25^{+/-} FOXP3^-$ naturale au fost izolate din sânge periferic de la un donator uman sănătos, extinse și activate. Celulele T au fost apoi caracterizate în ceea ce privește exprimarea FOXP3 și CTLA-4 prin citometrie în flux și au fost evaluate în ceea ce privește stabilitatea descendenței prin examinarea metilării CpG ADN-ului la regiunile CpG din cadrul locilor *FOXP3* și *CTLA4*. Așa cum se cunoaște în domeniu, hipometilarea la aceste situsuri CpG poate fi utilizată pentru a delimita cu precizie liniile de celule T efectoare de cele reglatoare (Waight și colab., 2015, J. Immunol. 194(3): 878-882).

PBMC-urile au fost izolate prin gradient Ficoll din acoperirile buffy de la donatori sănătoși (Research Blood Components, LLC) și apoi au fost îmbogățite pentru celule T efectoare (Teff-uri) sau celule T reglatoare naturale (Treg-uri) utilizând izolarea cu bile magnetice (MACS, Miltenyi). Teff-urile sau Treg-urile îmbogățite au fost activate cu microbule CD3-CD28 (raport 1:1 bile:celulă; Invitrogen) și cu IL-2 uman recombinant timp de șapte zile în mediu RPMI suplimentat cu 10% FBS inactivat termic la 37°C și 5% CO₂. După stimulare, celulele au fost evaluate în ceea ce privește exprimarea FOXP3 și CTLA-4 prin citometrie în flux. Pentru a reduce legarea nespecifică, celulele au fost pre-incubate cu un anticorp de blocare FcγR (Biolegend) în tampon FACS (PBS, 2 mM EDTA, 0,5% BSA, pH 7,2) timp de 15 minute la temperatura ambiantă. Probele au fost apoi spălate de două ori în tampon FACS și colorate cu un panou de linie de CD3, CD4, CD8, CD25, precum și un marker de moarte celulară fixabil, timp de 30 de minute la 4°C. Pentru a se evalua exprimarea membranară a CTLA-4, colorarea CTLA-4 a fost efectuată la 37°C. Pentru colorarea FOXP3 și CTLA-4 intracelular, probele au fost spălate de două ori, fixate, permeabilizate și incubate cu un anticorp anti-FOXP3 (PCH101) și respectiv un anticorp anti-CTLA-4 (BNI3), timp de 30 de minute la 4°C. Probele au fost apoi spălate de două ori și analizate utilizând citometrul de flux LSRFortessa (BD Biosciences). Graficele FACS au fost analizate

folosind o combinație de software FACS DIVA și WEHI Weasel. Pentru analiza metilării CpG, ADN-ul total a fost izolat din aproximativ 1×10^5 celule T naive CD4⁺, Teff-uri activate, sau Treg-uri activate și supuse la pirosecvențiere.

Așa cum este ilustrat în Figura 11A, a fost detectat un nivel ridicat de exprimare a FOXP3 pe Treg-uri activate, precum și niveluri ridicate de exprimare atât intracelulară, cât și membranară a CTLA-4. În schimb, Teff-urile activate au prezentat niveluri reduse de FOXP3, CTLA-4 intracelular și CTLA-4 membranar în comparație cu Treg-urile activate. În special, s-a observat o exprimare substanțial mai scăzută a CTLA-4 membranar pentru Teff-urile activate în comparație cu Treg-urile activate. Figura 11B arată în plus că Treg-urile activate au prezentat de asemenea regiuni CpG de *FOXP3* și *CTLA4* hipometilate în comparație cu Teff-urile naive și activate de la același donator.

6.2.8 Efectul anticorpilor anti-CTLA-4 asupra citotoxicității celulare dependente de anticorpi a celulelor T umane care exprimă CTLA-4

În acest exemplu, efectul anticorpului anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi) sau al variantelor Fc ale acestuia asupra citotoxicității celulare dependente de anticorpi (ADCC) a celulelor T umane care exprimă CTLA-4 a fost evaluat utilizând microscopia de conținut ridicat a activării 3/7 a caspazei pentru a cuantifica activitatea ADCC.

Pe scurt, celulele țintă care exprimă CTLA-4 au fost co-cultivate cu celule NK-92 care exprimă FcγRIIIA, după opsonizarea cu 10 μg/ml de anticorp anti-CTLA-4 sau variante Fc ale acestuia, așa cum este descris mai jos. Într-un prim experiment, celulele Jurkat modificate prin inginerie pentru a exprima constitutiv CTLA-4 uman de suprafață celulară au fost utilizate drept celule țintă. Celulele Jurkat care exprimă CTLA-4 au fost generate prin transducerea liniei de celule Jurkat cu *trCTLA4* (domeniul intracelular îndepărtat) sub controlul promotorului EF1α, așa cum este descris în Nakaseko și colab. (1999, J. Exp. Med. 190(6): 765-774). Într-un al doilea experiment, celulele T reglatoare și efectoare umane activate primare au fost utilizate drept celule țintă. Celulele țintă care exprimă CTLA-4 și celulele NK-92 care exprimă FcγRIIIA-158V au fost colorate diferențial folosind trasori de celule vii roșii și albaștri (Thermo Fisher) și co-cultivate la un raport de celule 1:1 ($1,5 \times 10^3$ celule/godeu în plăci cu 384

de godeuri). Probele au fost tratate cu 10 µg/ml de AGEN1884.H3 (IgGi), AGEN1884.H3 (IgGi N297A), AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), AGEN1884.H3 (IgGi S267E/L328F), AGEN1884.H3 (IgGi) afucozilat, sau un izotip de anticorp martor (IgGi). Probele au fost apoi evaluate în ceea ce priveşte inducerea apoptozei în timp prin imagistica confocală în viu a substratului de caspază 3/7, care are fluorescenţă după scindarea de către caspaza activată. Imaginile probelor au fost obţinute la fiecare 20 de minute timp de şase ore. Activitatea procentuală ADCC este măsurată ca număr de celule apoptotice raportat la numărul total de celule în fiecare condiţie.

Aşa cum este ilustrat în Figura 12A, varianta Fc a anticorpului AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), anticorpul AGEN1884.H3 afucozilat şi anticorpul AGEN1884.H3 (IgGi) au indus fiecare o activitate substanţial mai mare a ADCC în celulele Jurkat modificate prin inginerie pentru a exprima CTLA-4 de suprafaţă celulară în raport cu varianta AGEN1884.H3 (IgGi N297A), varianta AGEN1884.H3 (IgGi S267E/L328F) şi anticorpul martor al izotipului (IgGi). Varianta Fc a anticorpului AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) şi anticorpul AGEN1884.H3 afucozilat au indus creşteri mai mari ale activităţii ADCC în comparaţie cu anticorpul AGEN1884.H3 (IgGi). Aşa cum este ilustrat în Figura 12B, varianta Fc a anticorpului AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E) a indus cele mai ridicate niveluri de ADCC atât în celulele T efectoare primare activate umane (panoul din stânga) cât şi în celulele T reglatoare primare activate umane (panoul din dreapta), urmat de anticorpul AGEN1884.H3 afucozilat. Anticorpul AGEN1884.H3 (IgGi) a indus, de asemenea, niveluri uşor mai ridicate de ADCC în comparaţie cu martorii. Anticorpii rămaşi testaţi au indus o activitate ADCC mică sau deloc în oricare dintre celulele T efectoare sau reglatoare. În special, varianta Fc a anticorpului AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) şi anticorpul afucozilat AGEN1884.H3 au indus fiecare ADCC substanţial mai mare în celulele T reglatoare în comparaţie cu celulele T efectoare.

6.2.9 Efectul anticorpilor anti-CTLA-4 în combinaţie cu un anticorp anti-PD-1 asupra funcţionalităţii celulelor T

În acest exemplu, a fost examinat efectul anticorpilor anti-CTLA-4 în combinaţie cu un anticorp anti-PD-1 asupra funcţiei celulelor T umane primare.

Pe scurt, au fost izolate PBMC-uri prin gradient Ficoll din acoperirile buffy de la donatori sănătoși (Research Blood Components, LLC) a doi donatori umani. Acest experiment a fost efectuat de două ori pe PBMC-uri colectate de la fiecare donator, pentru un total de două replicare per donator. Pentru fiecare replicat, PBMC-urile izolate au fost incubate timp de patru zile în condiții de cultură stimulatorie cu o titrare a dozei de anticorp anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi), o variantă Fc de anticorp anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E), sau un anticorp martor de izotip (IgGi), în combinație cu o doză fixată (5 µg/ml) dintr-un anticorp antagonist anti-PD-1 de referință sau un izotip de anticorp martor (IgG₄). Condițiile de cultură stimulatorie au fost definite drept celule suspendate în mediu RPMI, suplimentate cu 100 ng/ml de superantigen SEA (Sigma-Aldrich), 10% FBS inactivat termic la 37°C și 5% CO₂. După incubare, supernatantele libere de celule au fost testate în ceea ce privește producția de IL-2 utilizând un imunotest AlphaLISA (Perkin-Elmer). Datele au fost colectate folosind EnVision® Multilabel Plate Reader (Perkin-Elmer), și concentrația de IL-2 a fost determinată folosind o curbă standard de IL-2. Valorile au fost interpolate și reprezentate grafic folosind software-ul Graphpad Prism.

Așa cum este ilustrat în Figurile 13A-13D, anticorpul anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi) și varianta Fc a anticorpului anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG₁ S239D/A330L/I332E) a indus fiecare o producție crescută de IL-2 în raport cu martorii de izotip sau anticorpul anti-PD-1 de referință singur. Producția de IL-2 a fost îmbunătățită în continuare când AGEN1884.H3 sau AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E) a fost combinat cu anticorpul anti-PD-1 de referință. Indiferent dacă a fost administrat cu un izotip de anticorp martor sau în combinație cu anticorp anti-PD-1 de referință, varianta Fc a anticorpului anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgGi S239D/A330L/I332E) a indus o creștere mai mare a producției de IL-2 în comparație cu AGEN1884.H3 (IgGi). Acest efect a fost consecvent în replicare pentru primul donator (Figurile 13A și 13B) și al doilea donator (Figurile 13C și 13D).

6.3 Exemplul 3: Cartografierea epitopului anticorpului anti-CTLA-4

Interacțiunea fragmentului Fab al AGEN1884 (AGEN1884-Fab) cu domeniul extracelular al CTLA-4 uman a fost studiată prin spectrometrie de masă cu schimb

hidrogen-deuteriu (HDX). Domeniul extracelular al CTLA-4 singur sau în combinație cu AGEN1884-Fab, în soluție salină tamponată cu fosfat la pH 7,4, a fost diluat cu un volum de zece ori de tampon de etichetare cu oxid de deuteriu și incubat pentru perioade diferite de timp (0, 60, 300, 1800, și 7200 secunde) la temperatura camerei. Schimbul de deuteriu cu hidrogen a fost stins prin adăugarea unui volum de clorhidrat de guanidină 4 M, tampon TCEP 0,85 M (tris(2-carboxietil)fosfină) și pH-ul final a fost 2,5. Probele au fost apoi supuse la digestie pe coloană de pepsină/protează tip XIII și analiza prin LC-MS. Spectrele de masă au fost înregistrate numai în modul MS. Pentru calcularea încorporării deuteriului, spectrele de masă pentru o anumită peptidă au fost combinate peste picul cromatogramei ionului extras și a fost calculată media în greutate m/z. Creșterea masei de la masa peptidei native (0 minut) la masa medie în greutate corespunde nivelului de încorporare a deuteriului. Curbele de acumulare a deuteriului în timpul de schimb pentru toate peptidele au fost reprezentate grafic pentru analize ulterioare și au fost comparate cu software-ul HDExaminer.

Cele mai multe dintre peptidele CTLA-4 au prezentat niveluri identice sau similare de deuteriu cu și fără Fab CTLA-4 anti-uman prezent. Totuși, s-a descoperit că mai multe segmente de peptide au scăzut semnificativ încorporarea de deuteriu la legarea de Fab. Toate resturile din acest paragraf sunt numerotate conform cu SECV ID NR: 33. Două regiuni, resturile 80-82 (QVT, SECV ID NR: 39) și resturile 135-149 (YPPPYLIGINGTQI, SECV ID NR: 37), au prezentat protecție puternică la deuteriu atunci când CTLA-4 uman a fost legat la Fab. Cea mai puternică scădere a absorbției de deuteriu a fost observată la resturile 140-141 (YL) care, astfel, părea a fi o caracteristică principală a epitopului AGEN1884 pe CTLA-4. Inspecția secvențelor de CTLA-4 uman și de maimuță cynomolgus, dintre care ambele leagă puternic AGEN1884 (datele nu sunt prezentate), relevă identitatea aproape completă a secvenței în cele două regiuni descrise mai sus, cu excepția unei substituții de metionină pentru leucină la poziția 141 (Figura 14A). Prin contrast, AGEN1884 nu se leagă într-o măsură semnificativă nici la CTLA-4 de șoarece sau de șobolan (datele nu sunt prezentate) care diferă de CTLA-4 uman la resturile 140-143 (YLG I, SECV ID NR: 34) la trei din patru poziții (Figura 14A). Date suplimentare referitoare la selectivitate arată că AGEN1884 se leagă cu specificitate ridicată la CTLA-4 uman și de maimuță cynomolgus și nu la alți membri ai familiei de CD28 înrudiți, inclusiv CD28, ICOS, BTLA și PD-1 (datele nu sunt prezentate). Compararea secvenței dintre aceste

proteine înrudite arată că proteinele non-CTLA-4 diferă toate la resturile 140-143 (YLG I, SECV ID NR: 34) (Figura 14B), susținând în continuare importanța acestui epitop pentru legarea AGEN1884.