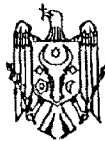




MD 4795 C1 2022.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4795** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2017 0022 (22) Data depozit: 2015.07.31 (31) Nr.: 201410377352.9 (32) Data: 2014.08.01 (33) Țara: CN (41) Data publicării cererii: 2017.06.30, BOPI nr. 6/2017	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2022.02.28, BOPI nr. 2/2022 (85) 2017.02.27 (86) PCT/CN2015/085721, 2015.07.31 (87) WO 2016/015675 A1, 2016.02.04
(71) Solicitant: AKESO BIOPHARMA INC., CN (72) Inventatori: LI Baiyong, CN; XIA Yu, CN; WANG Zhongmin, CN; ZHANG Peng, CN; PANG Xinghua, CN (73) Titular: AKESO BIOPHARMA INC., CN (74) Mandatar autorizat: LAZICOV Tatiana	

(54) Anticorp monoclonal anti-CTLA4 sau fragment de legare a acestuia la antigen, compoziție farmaceutică și utilizarea lor

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la domeniile terapiei tumorilor și imunologiei moleculare, și anume la un anticorp monoclonal anti-CTLA4 sau la un fragment de legare a acestuia la antigen, la o compoziție farmaceutică și la utilizarea acestora.

2
Anticorpul monoclonal, conform invenției, poate bloca legarea CTLA4 cu B7, îndepărta imunosupresia organismului de către CTLA4 și activa limfocitele T.
Secvențe: 34
Revendicări: 14
Figuri: 34

MD 4795 C1 2022.09.30

(54) Anti-CTLA4 monoclonal antibody or antigen binding fragment thereof, medicinal composition and use thereof

(57) Abstract:

1
The invention relates to the fields of tumor treatment and molecular immunology, namely to an anti-CTLA4 monoclonal antibody or an antigen binding fragment thereof, a medicinal composition thereof, and a use thereof.

The monoclonal antibody, according to the invention, can block CTLA4 from

2
binding to B7, eliminate the immunosuppressive effect of CTLA4 on the host and activate T lymphocytes.

Sequences: 34

Claims: 14

Fig.: 34

(54) Анти-CTLA4 моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, фармацевтическая композиция и их применение

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к областям терапии опухолей и молекулярной иммунологии, а именно к анти-CTLA4 моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, фармацевтической композиции и их применению.

2
Моноклональное антитело, согласно изобретению, может блокировать связывание CTLA4 с B7, снимать иммуносупрессию организма CTLA4 и активировать Т-лимфоциты.

Последовательности: 34

П. формулы: 14

Фиг.: 34

Descriere:

Prezenta invenție se referă la domeniile terapiei tumorale și imunologiei moleculare. Prezenta invenție se referă la un anticorp monoclonal anti-CTLA4 sau un fragment al acestuia de legare la antigen, la compoziția lor farmaceutică, secvențele lor de codificare și utilizarea acestora în metode de diagnostic, profilaxie, terapie și/sau terapie adjuvantă.

Antigenul 4 (abreviat CTLA4), asociat cu limfocitele T citotoxice, are un grad înalt de similaritate cu molecula CD28 după structura genei, localizarea cromozomială, homologia secvenței și expresia genică. Ambele molecule constituie receptori pentru molecula co-stimulatoră B7, exprimată în principal pe suprafața limfocitelor T activate. Cu toate acestea, în calitate de semnal co-stimulator pentru activarea limfocitelor, CTLA4 îndeplinește funcția opusă CD28. După legarea sa cu B7, CTLA4 poate inhiba activarea limfocitelor T murine și umane, îndeplinind un rol regulator negativ în activarea limfocitelor T.

CTLA4 (mAbs) sau liganzii CTLA4 pot preveni legarea CTLA4 la liganzii săi nativi, blocând astfel transmiterea semnalului regulator negativ limfocitelor T prin intermediul CTLA4 și îmbunătățind sensibilitatea limfocitelor T față de diferiți antigeni. Sub acest aspect, rezultatele studiilor *in vivo* și *in vitro* în mare măsură se conformează. În prezent, au fost obținuți câțiva CTLA4 (mAbs) (10D1, 11.2.2) care se află în proces de testare clinică în tratamentul cancerului de prostată, cancerului de vezică urinară, cancerului colorectal, cancerului tractului gastro-intestinal, cancerului de ficat, melanomului malign etc. [1, 2, 3]. Printre acești anticorpi, anticorpul 10D1 și 11.2.2 sunt considerați ca anticorpi monoclonali anti-CTLA4 care demonstrează cel mai bun efect.

Interleukina-2 (IL-2) este produsă de către limfocitele T. Aceasta reprezintă un factor de creștere care reglementează subgrupul limfocitelor T. De asemenea, aceasta constituie un factor important de modulare a răspunsului imun. Ea poate stimula și activa expresia limfocitelor B și participă în răspunsul umoral, în hematopoieză și în supraviețuirea tumorilor. IL-2 uman recombinat a fost aprobat de către Departamentul SUA privind controlul asupra calității produselor alimentare și preparatelor farmaceutice pentru tratamentul tumorilor maligne (inclusiv a melanomului, tumorilor renale etc.). În plus, efectul său a fost cercetat în studiile clinice consacrate tratamentului infecției virale cronice (Pharmacologic administration of interleukin-2 Chavez, A.R., și colab., Ann. N.-Y Acad. Sci., 2009, 1182: 14-27).

Ca factori importanți care afectează funcția limfocitelor T, CTLA4 și CTLA4 mAbs pot avea un efect terapeutic specific asupra bolilor prin tulburarea micromediului imun al organismului. Acestea au o eficiență ridicată și elimină deficiențele preparatelor medicamentoase tradiționale, deschizând o nouă cale pentru terapia genică. CTLA4 și CTLA4 mAbs sunt testate în cadrul unor experimente la diferite etape ale studiilor clinice. De exemplu, în bolile autoimune acestea au inhibat în mod eficient hipersensibilitatea cailor respiratorii în modelele animale de astm, au prevenit dezvoltarea bolilor reumatice, au mediat toleranța imună la allo-transplant în organism și a.m.d. Pe de altă parte, cu toate că terapia genică biologică nu a demonstrat nici un efect secundar nedorit în studiile clinice pe termen scurt, trebuie să se acorde atenție unor posibile efecte în cazul utilizării sale prelungite. De exemplu, blocarea excesivă a semnalizării prin intermediul CTLA4 folosind CTLA4 mAbs poate conduce la dezvoltarea bolilor autoimune. Deoarece anticorpul se poate lega în mod specific cu antigenii lor și pot induce liza celulelor țintă sau pot bloca mersul procesului patologic, dezvoltarea și utilizarea medicamentelor pe bază de anticorpi, în special de anticorpi umanizați, au o mare importanță în tratamentul clinic al tumorilor maligne și al altor afecțiuni imune la om.

În timpul de față există încă necesitatea de a dezvolta noi anticorpi, care să blocheze legarea CTLA4 cu B7, și variante umanizate ale acestora.

După cercetări intensive și eforturi creative, folosind sistemul de expresie în celulele de mamifer, autorii prezentei invenții au obținut un CTLA4 recombinant care a fost folosit în calitate de imunogen pentru imunizarea șoarecilor. Celulele hibridoma au fost obținute prin fuziunea celulelor splenice murine cu celule de mielom. După screeningul unui mare număr de probe, autorii prezentei invenții au obținut o linie de celule hibridoma, capabilă să secrete și să producă un anticorp monoclonal concret, care se leagă în mod specific la CTLA4 și poate bloca cu o eficiență înaltă legarea CTLA4 cu B7. De asemenea, au fost obținuți anticorpi umanizați. Astfel, se propun următoarele invenții.

Într-un aspect al său prezenta invenție se referă la un anticorp sau la un fragment al acestuia de legare la antigen, care se leagă cu CTLA4 uman, selectat din grupa constând din:

- a) anticorp sau fragment al acestuia de legare la antigen, care cuprinde regiunea variabilă a lanțului greu SECV. ID NO: 14 și regiunea variabilă a lanțului ușor SECV. ID NO: 16; și
- b) anticorp sau fragment al acestuia de legare la antigen care cuprinde regiunea variabilă a lanțului greu SECV. ID NO: 14 și regiunea variabilă a lanțului ușor SECV. ID NO: 16, în care în secvența

SECV. ID NO: 14 metionina din poziția 18 poate fi substituită cu un aminoacid selectat din grupa constând din: leucină, valină, izoleucină și alanină.

O variantă de realizare a prezentei invenții este anticorpul menționat anterior sau un fragment al acestuia de legare la antigen, în care metionina din poziția 18 în SECV. ID Nr. 14 este substituită cu leucină și regiunea variabilă a lanțului ușor SECV. ID Nr. 16.

O altă variantă de realizare a prezentei invenții este anticorpul sau un fragment al acestuia de legare la antigen, care reprezintă un anticorp umanizat sau un fragment al acestuia de legare la antigen.

O altă variantă de realizare a prezentei invenții este anticorpul sau un fragment al acestuia de legare la antigen, care se leagă la CTLA4 uman cu un K_D mai mic de aproximativ 10^{-5} M, după cum a fost determinat prin rezonanță plasmatică de suprafață.

O altă variantă de realizare a prezentei invenții este anticorpul sau un fragment al acestuia de legare la antigen, în care anticorpul sau fragmentul acestuia de legare la antigen:

- (a) blochează legarea CTLA4 uman cu B7 uman;
- (b) reglează activitatea CTLA4 uman;
- (c) înlătură imunosupresia organismului de către CTLA4 uman;
- (d) activează limfocitele T; și/sau
- (e) sporește nivelul de expresie al IL-2 în limfocitele T.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la una sau mai multe molecule de acizi nucleici izolate, care codifică anticorpul sau fragmentul acestuia de legare la antigen.

O variantă de realizare a prezentei invenții este una sau mai multe molecule de acizi nucleici izolate, în care una sau mai multe molecule de acizi nucleici izolate conțin secvența nucleotidică, reprezentată de secvența SECV. ID NO: 13 sau SECV. ID NO: 15.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la un vector, care conține o moleculă de acid nucleic izolată.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la o celulă gazdă care conține vectorul menționat mai sus.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la un procedeu de obținere a unui anticorp sau a unui fragment al acestuia de legare la antigen, care cuprinde etapele de cultivare a celulei gazdă, conform invenției, în condiții adecvate și de izolare a anticorpului sau a fragmentului acestuia de legare la antigen din cultura celulară.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la o compoziție farmaceutică cu conținut de un anticorp sau un fragment al acestuia de legare la antigen și un purtător farmaceutic acceptabil și/sau un adjuvant.

O altă variantă a prezentei invenții este anticorpul menționat mai sus sau un fragment al acestuia de legare la antigen pentru utilizare într-un procedeu de tratare a unui subiect, care este o ființă umană, suferindă de tumoare, cum ar fi melanom, tumoare renală/cancer renal, cancer de prostată, cancer de vezică urinară, cancer colorectal, cancer al tractului gastro-intestinal și/sau tumoare hepatică/cancer hepatic.

O altă variantă a prezentei invenții este anticorpul menționat sau un fragment al acestuia de legare la antigen pentru utilizare în procedeul de tratare a limfomului.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la un procedeu *in vitro*, care cuprinde etapa de introducere în celule a unei cantități eficiente de anticorp menționat mai sus sau dintr-un fragment al acestuia de legare la antigen, în care acest procedeu este selectat dintre următoarele procedee:

- (a) procedeu de detectare a nivelului de CTLA4 uman într-o probă,
- (b) procedeu de blocare a legării CTLA4 uman cu B7 uman,
- (c) procedeu de reglare a activității CTLA4 uman sau a nivelului de CTLA4 uman,
- (d) procedeu de înlăturare a imunosupresiei organismului de către CTLA4 uman,
- (e) procedeu de activare a limfocitelor T, sau
- (f) procedeu de creștere a nivelului de exprimare a IL-2 în limfocitele T.

Într-un aspect prezenta dezvoltare se referă la un anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia de legare la antigen, în care respectivul anticorp monoclonal cuprinde regiuni de determinare a complementarității (CDR-uri), selectate dintre următoarele:

HCDR1, care cuprinde secvența de aminoacizi SECV. ID Nr. 27,
HCDR2, care cuprinde secvența de aminoacizi SECV. ID Nr. 28, și
HCDR3, care cuprinde secvența de aminoacizi SECV. ID Nr. 29;
și/sau

LCDR1, care cuprinde secvența de aminoacizi SECV. ID Nr. 30,
LCDR2, care cuprinde secvența de aminoacizi SECV. ID Nr. 31, și

LCDR3, care cuprinde secvența de aminoacizi, selectată dintre SECV. ID Nr. 32, SECV. ID Nr. 33 și SECV. ID Nr. 34.

Anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia de legare la antigen conform oricăreia dintre aspectele ale prezentei dezvoltării, în care secvența de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului greu (VH) a acestui anticorp monoclonal este selectată dintre SECV. ID Nr. 6, SECV. ID Nr. 10, SECV. ID Nr. 14 și SECV. ID Nr. 18;

și/sau

secvența de aminoacizi a regiunii variabile a lanțului ușor (VL) a acestui anticorp monoclonal este selectată dintre SECV. ID Nr. 8, SECV. ID Nr. 12, SECV. ID Nr. 16, SECV. ID Nr. 20, SECV. ID Nr. 22 și SECV. ID Nr. 24.

Anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia de legare la antigen în conformitate cu oricare din aspectele ale prezentei dezvoltării, în care acest anticorp monoclonal cuprinde:

- (1) VH, prezentată în SECV. ID Nr. 6 și VL, prezentată în SECV. ID Nr. 8;
- (2) VH, prezentată în SECV. ID Nr. 10 și VL, prezentată în SECV. ID Nr. 12;
- (3) VH, prezentată în SECV. ID Nr. 14 și VL, prezentată în SECV. ID Nr. 16;
- (4) VH, prezentată în SECV. ID Nr. 18 și VL, prezentată în SECV. ID Nr. 20;
- (5) VH, prezentată în SECV. ID Nr. 14 și VL, prezentată în SECV. ID Nr. 22; sau
- (6) VH, prezentată în SECV. ID Nr. 14 și VL, prezentată în SECV. ID Nr. 24.

În prezenta dezvoltare, grupurile menționate mai sus (1)-(6) conțin secvențele de aminoacizi ale regiunii variabile a lanțului greu și ale regiunii variabile a lanțului ușor ale anticorpilor 8D2/8D2(Re), 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17, respectiv.

În particular, metionina (Met) din poziția 18 SECV. ID Nr. 6, SECV. ID Nr. 10 și SECV. ID Nr. 14 este înlocuită în mod independent cu un aminoacid selectat dintre următorii aminoacizi: leucină (Leu), valină (Val), izoleucină (Ile) sau alanină (Ala).

Preparatele terapeutice pe bază de anticorpi, în special pe anticorpi monoclonali (MAB), au demonstrat o eficacitate excelentă în tratamentul unor anumite boli. Procedul standard de obținere a unor astfel de anticorpi terapeutici constă în imunizarea animalului cu un antigen, obținerea de la acest animal imunizat a anticorpilor pentru acest antigen, sau îmbunătățirea anticorpilor care au o afinitate scăzută față de antigen folosind maturarea afinității. Cu toate acestea, un astfel de procedeu consumă mult timp, necesită o muncă intensă și, de asemenea, adesea prin intermediul acestuia nu pot fi obținuți anticorpi specifici pentru un anumit epitop al antigenului.

Legarea la antigen depinde de regiunile variabile ale lanțului ușor și lanțului greu; regiunea variabilă a fiecărui lanț cuprinde trei porțiuni hipervariabile, denumite și regiune de determinare a complementarității (CDR) (lanțul greu (H) cuprinde HCDR1, HCDR2 și HCDR3, iar lanțul ușor (L) cuprinde LCDR1, LCDR2 și LCDR3; vezi definiția la Kabat și colab., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition (1991), Vol. 1-3, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md).

Secvențele de aminoacizi ale CDR-urilor din secvențele anticorpilor monoclonali ale aspectelor menționate mai sus (1)-(6) au fost analizate prin procedee tehnice bine cunoscute specialiștilor în domeniul respectiv al tehnicii, de exemplu, prin intermediul analizei bazei de date VBASE2. Rezultatele sunt prezentate în continuare.

(1) Secvențele de aminoacizi a 3 CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului greu sunt prezentate mai

jos:

HCDR1: GFTFSDNW (SECV. ID Nr. 27),
HCDR2: IRNKPYNYET (SECV. ID Nr. 28),
HCDR3: TAQFAY (SECV. ID Nr. 29).

Secvențele de aminoacizi a 3 CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului ușor sunt prezentate mai jos:

LCDR1: ENIYGG (SECV. ID Nr. 30),
LCDR2: GAT (SECV. ID Nr. 31),
LCDR3: QNVLRSPFT (SECV. ID Nr. 32).

(2) Secvențele de aminoacizi a 3 CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului greu sunt prezentate mai

jos:

HCDR1: GFTFSDNW (SECV. ID Nr. 27),
HCDR2: IRNKPYNYET (SECV. ID Nr. 28),
HCDR3: TAQFAY (SECV. ID Nr. 29).

Secvențele de aminoacizi a 3 CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului ușor sunt prezentate mai jos:

LCDR1: ENIYGG (SECV. ID Nr. 30)
LCDR2: GAT (SECV. ID Nr. 31),
LCDR3: QNVLRSPFT (SECV. ID Nr. 32).

(3) Secvențele de aminoacizi a 3 CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului greu sunt prezentate mai

jos:

HCDR1: GFTFSDNW (SECV. ID Nr. 27),

HCDR2: IRNKPYN YET (SECV. ID Nr. 28),

HCDR3: TAQFAY (SECV. ID Nr. 29).

Secvențele de aminoacizi a 3 CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului ușor sunt prezentate mai jos:

LCDR1: ENIYGG (SECV. ID Nr. 30),

LCDR2: GAT (SECV. ID Nr. 31),

LCDR3: QNVLRSPFT (SECV. ID Nr. 32).

(4) Secvențele de aminoacizi a 3 CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului greu sunt prezentate mai jos:

HCDR1: GFTFSDNW (SECV. ID Nr. 27),

HCDR2: IRNKPYN YET (SECV. ID Nr. 28),

HCDR3: TAQFAY (SECV. ID Nr. 29).

Secvențele de aminoacizi a 3 CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului ușor sunt prezentate mai jos:

LCDR1: ENIYGG (SECV. ID Nr. 30),

LCDR2: GAT (SECV. ID Nr. 31),

LCDR3: QNVLRSPFT (SECV. ID Nr. 32).

(5) Secvențele de aminoacizi a 3 CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului greu sunt prezentate mai jos:

HCDR1: GFTFSDNW (SECV. ID Nr. 27),

HCDR2: IRNKPYN YET (SECV. ID Nr. 28),

HCDR3: TAQFAY (SECV. ID Nr. 29).

Secvențele de aminoacizi a 3 CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului ușor sunt prezentate mai jos:

LCDR1: ENIYGG (SECV. ID Nr. 30),

LCDR2: GAT (SECV. ID Nr. 31),

LCDR3: QNVLSRHPG (SECV. ID Nr. 33).

(6) Secvențele de aminoacizi a 3 CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului greu sunt prezentate mai jos:

HCDR1: GFTFSDNW (SECV. ID Nr. 27),

HCDR2: IRNKPYN YET (SECV. ID Nr. 28),

HCDR3: TAQFAY (SECV. ID Nr. 29).

Secvențele de aminoacizi a 3 CDR-uri ale regiunii variabile a lanțului ușor sunt prezentate mai jos:

LCDR1: ENIYGG (SECV. ID Nr. 30),

LCDR2: GAT (SECV. ID Nr. 31),

LCDR3: QNVLSRPG (SECV. ID Nr. 34).

Anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia de legare la antigen în conformitate cu oricare dintre variantele de realizare a prezentei invenții, în care acest anticorp monoclonal sau fragmentul acestuia de legare la antigen este selectat dintre Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, dintre un fragment al regiunii de determinare a complementarității, un anticorp monocatenar (de exemplu, scFv), un anticorp umanizat, un anticorp hibrid sau un diacorp.

Anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia de legare la antigen în conformitate cu oricare variantă de realizare a prezentei invenții, în care acest anticorp monoclonal se leagă la proteina CTLA4 cu un K_D mai mic de aproximativ 10⁻⁵ M, cum ar fi mai puțin de aproximativ 10⁻⁶ M, 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M, 10⁻⁹ M sau 10⁻¹⁰ M, sau mai puțin.

Anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia de legare la antigen în conformitate cu oricare dintre variantele de realizare a prezentei invenții, în care acest anticorp monoclonal cuprinde regiuni care nu sunt CDR, și aceste regiuni non-CDR sunt obținute din anticorpul unei specii diferite de cea a șoarecelui, de exemplu, din anticorpi umani.

Anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia de legare la antigen conform prezentei invenții reprezintă un anticorp monoclonal anti-CTLA4 sau un fragment al acestuia de legare la antigen, care se poate lega în mod specific la CTLA4.

Anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia de legare la antigen în conformitate cu oricare dintre aspectele ale prezentei dezvăluiri pentru utilizare în prevenirea și/sau tratamentul și/sau terapia adjuvantă și/sau diagnosticarea tumorii; în special, a tumorii selectate dintre un melanom, o tumoră renală/cancer de rinichi, un cancer de prostată, un cancer de vezică urinară, un cancer colorectal, un cancer al tractului gastrointestinal și o tumoră hepatică/cancer de ficat.

Anticorp monoclonal conform oricăreia dintre variantele de realizare a prezentei invenții pentru utilizare în:

blocarea legării CTLA4 cu B7,

reglarea (de exemplu, suprimarea) activității CTLA4 sau nivelului de CTLA4,

îndepărtarea imunosupresiei organismului prin CTLA4 sau

activarea limfocitelor T sau creșterea nivelului de expresie a IL-2 în limfocitele T.

Într-un alt aspect, prezenta dezvăluire se referă la o moleculă de acid nucleic izolată cuprinzând o secvență nucleotidică capabilă să codifice regiunea variabilă a lanțului greu de anticorp, în care această regiune variabilă a lanțului greu de anticorp cuprinde CDR-uri având secvențe de aminoacizi SECV. ID Nr. 27-29; în special, regiunea variabilă a lanțului greu de anticorp are o secvență de aminoacizi, prezentată în SECV. ID Nr. 6, SECV. ID Nr. 10, SECV. ID Nr. 14 sau SECV. ID Nr. 18; mai concret, molecula de acid nucleic include o secvență de nucleotide, prezentată în SECV. ID Nr. 5, SECV. ID Nr. 9, SECV. ID Nr. 13 sau SECV. ID Nr. 17.

Prezenta invenție se referă, de asemenea, la molecule de acid nucleic izolate care codifică anticorpul monoclonal sau un fragment al acestuia de legare la antigen conform prezentei invenții. Astfel de molecule de acid nucleic pot fi izolate din celulele hibridoma sau preparate prin tehnici recombinante de inginerie genetică sau prin procedee de sinteză chimică.

În următorul său aspect, prezenta dezvăluire se referă la o moleculă de acid nucleic izolată cuprinzând o secvență nucleotidică capabilă să codifice regiunea variabilă a lanțului ușor de anticorp, în care această regiune variabilă a lanțului ușor de anticorp cuprinde:

1) CDR-uri având secvențele de aminoacizi din SECV. ID Nr. 30-32;

2) CDR-uri având secvențele de aminoacizi din SECV. ID Nr. 30, SECV. ID Nr. 31 și SECV. ID Nr. 33; sau

3) CDR-uri având secvențele de aminoacizi din SECV. ID Nr. 30, SECV. ID Nr. 31 și SECV. ID Nr. 34;

în particular, regiunea variabilă a lanțului ușor de anticorp cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV. ID Nr. 8, SECV. ID Nr. 12, SECV. ID Nr. 16, SECV. ID Nr. 20, SECV. ID Nr. 22 sau SECV. ID Nr. 24;

mai concret, molecula de acid nucleic conține secvența de nucleotide prezentată în SECV. ID Nr. SECV. ID Nr. 7, SECV. ID Nr. 11, SECV. ID Nr. 15, SECV. ID Nr. 19, SECV. ID Nr. 21 sau SECV. ID Nr. 23.

În următorul său aspect, prezenta invenție se referă la un vector care conține o moleculă de acid nucleic izolată în conformitate cu oricare dintre variantele de realizare ale prezentei invenții. Vectorul conform prezentei invenții poate fi un vector de clonare sau un vector de expresie. Într-o variantă preferabilă de realizare a invenției, vectorul conform prezentei invenții constituie, de exemplu, o plasmidă, o cosmidă, un bacteriofag sau altele similare.

În următorul său aspect, prezenta invenție se referă la o celulă gazdă care cuprinde o moleculă de acid nucleic izolată în conformitate cu oricare dintre variantele de realizare ale prezentei invenții sau un vector conform prezentei invenții. Astfel de celule gazdă includ, fără a se limita la acestea, celule procariote, cum ar fi celulele *E. coli*, și celule eucariote, cum ar fi celulele de drojdie, celulele de insecte, celulele vegetale și celulele animale (de exemplu, celulele de mamifere, inclusiv celulele murine, celulele umane sau altele similare). Celulele conform prezentei invenții pot reprezenta, de asemenea, o linie de celule, cum ar fi linia de celule 293T.

În următorul său aspect, prezenta invenție se referă la un procedeu de preparare a unui anticorp monoclonal sau a unui fragment al acestuia de legare la antigen în conformitate cu oricare variantă de realizare a prezentei invenții, procedeul în cauză cuprinde etapele de cultivare a celei gazdă în condiții adecvate conform prezentei invenții și izolarea din cultură celulară a anticorpului monoclonal sau a fragmentului acestuia de legare la antigen.

În următorul său aspect, prezenta dezvăluire se referă la un conjugat care cuprinde un anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia de legare la antigen și molecula conjugată, în care anticorpul monoclonal reprezintă un anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia de legare la antigen în conformitate cu oricare variantă de realizare a prezentei invenții, și molecula conjugată constituie un marker detectabil. În particular, molecula conjugată reprezintă un radioizotop, o substanță fluorescentă, o substanță luminescentă, o substanță cromogenă sau o enzimă (de exemplu, peroxidază din hrean).

În următorul său aspect, prezenta dezvăluire se referă la un kit de reactivi care cuprinde un anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia de legare la antigen în conformitate cu oricare variantă de realizare a prezentei invenții, sau un conjugat al prezentei invenții; în particular, kitul de reactivi cuprinde suplimentar un al doilea anticorp care recunoaște în mod specific respectivul anticorp monoclonal sau fragmentul acestuia de legare la antigen; la necesitate, al doilea anticorp suplimentar menționat cuprinde un marker detectabil, de exemplu, un radioizotop, o substanță fluorescentă, o substanță luminescentă, o substanță cromogenă sau o enzimă (de exemplu, peroxidază din hrean).

În următorul său aspect, prezenta dezvăluire se referă la utilizarea unui anticorp monoclonal sau a unui fragment al acestuia de legare la antigen, în conformitate cu oricare dintre variantele de realizare a

prezentei invenții, la prepararea kitului de reactivi, care este utilizat la detectarea prezenței sau a nivelului de CTLA4 într-o probă.

Un alt aspect se referă la o compoziție farmaceutică care cuprinde un anticorp monoclonal sau un fragment al acestuia de legare la antigen în conformitate cu oricare dintre variantele de realizare a prezentei invenții, sau un conjugat conform prezentei invenții; dacă este necesar, compoziția farmaceutică menționată mai cuprinde suplimentar un purtător acceptabil farmaceutic și/sau un excipient.

Un alt aspect se referă la utilizarea unui anticorp monoclonal sau a unui fragment al acestuia de legare la antigen, în conformitate cu oricare dintre variantele de realizare a prezentei invenții, sau a unui conjugat în conformitate cu prezenta invenție, la prepararea unui medicament pentru aplicare în prevenirea și/sau tratamentul și/sau terapia adjuvantă și/sau diagnosticarea tumorii; în particular, a tumorii selectate dintre un melanom, o tumoră renală/cancer de rinichi, un cancer de prostată, un cancer de vezică urinară, un cancer colorectal, un cancer al tractului gastrointestinal și o tumoră hepatică/cancer la ficat.

Un alt aspect se referă la utilizarea unui anticorp monoclonal sau a unui fragment al acestuia de legare la antigen, în conformitate cu oricare dintre variantele de realizare a prezentei invenții, sau a unui conjugat conform prezentei invenții, la prepararea următorului agent:

agentului care detectează prezența sau nivelul de CTLA4 într-o probă,

agentului care blochează legarea CTLA4 cu B7,

agentului care reglează (de exemplu, inhibă) activitatea CTLA4 sau nivelul de CTLA4,

agentului care înlătură imunosupresia organismului de către CTLA4,

agentului care activează limfocitele T, sau

agentului care crește nivelul de expresie al IL-2 în limfocitele T.

Un alt aspect se referă la un procedeu *in vivo* sau *in vitro* care cuprinde etapa de administrare în celule a unei cantități eficiente dintr-un anticorp monoclonal sau dintr-un fragment al acestuia de legare la antigen în conformitate cu oricare dintre variantele de realizare a prezentei invenții, sau a unui conjugat conform prezentei invenții, în care procedeu dat este selectat dintre următoarele procedee:

procedeu de detectare a prezenței sau a nivelului de CTLA4 într-o probă,

procedeu de blocare a legării CTLA4 cu B7,

procedeu de reglare (de exemplu, suprimare) a activității CTLA4 sau a nivelului de CTLA4,

procedeu de eliminare a imunosupresiei organismului de către CTLA4,

procedeu de activare a limfocitelor T, sau

procedeu de creștere a nivelului de expresie a IL-2 în limfocitele T.

Asemenea procedee pot fi utilizate în scopuri diagnostice sau terapeutice sau în scopuri non-diagnostice sau non-terapeutice (de exemplu, în cazuri în care proba este o probă de celule, și nu o probă obținută de la un pacient).

Un alt aspect se referă la un procedeu de profilaxie și/sau tratament și/sau tratament adjuvant și/sau diagnosticare a unei tumori cuprinzând administrarea la subiect a unei cantități eficiente dintr-un anticorp monoclonal sau dintr-un fragment al acestuia de legare la antigen în conformitate cu oricare aspect al prezentei invenții, sau dintr-un conjugat al prezentei invenții; în particular, a unei tumori selectate dintre un melanom, o tumoră renală/un cancer de rinichi, un cancer de prostată, un cancer de vezică urinară, un cancer colorectal, un cancer al tractului gastrointestinal și o tumoră hepatică/cancer de ficat.

În prezenta invenție, dacă nu se specifică altfel, termenii științifici și tehnici utilizați aici au aceeași semnificație care este înțeleasă în general de către specialiștii în domeniu. De asemenea, procedeele de cultură celulară, genetică moleculară, chimie a acizilor nucleici, imunologie care sunt utilizate aici constituie metodici folosite pe scară largă în domeniul corespunzător al tehnicii. În același timp, pentru o mai bună înțelegere a prezentei invenții, în continuare sunt prezentate definițiile și explicațiile termenilor relevanți.

În prezenta descriere, atunci când se face referire la secvența de aminoacizi a proteinei CTLA4 (antigenul 4 asociat limfocitelor citotoxice T), acest termen include proteina CTLA4 completă sau o porțiune extracelulară CTLA4ECD de CTLA4 (SECV. ID Nr. 2), sau un fragment care conține CTLA4ECD; acesta include, de asemenea, proteina de fuziune CTLA4ECD, de exemplu, un fragment fuzionat cu fragmentul Fc-proteină al IgG (mFc) murin (SECV. ID Nr.3). Cu toate acestea, după cum pot aprecia specialiștii în domeniul respectiv al tehnicii, o mutație sau o modificare (incluzând, fără limitare la aceasta, substituirea, distrugerea și/sau adăugarea) pot apărea în mod firesc sau pot fi introduse în mod artificial în secvența de aminoacizi a proteinei CTLA4, fără a afecta funcțiile sale biologice. Astfel, în prezenta invenție termenul de „proteină CTLA4” include toate aceste secvențe, inclusiv secvența prezentată în SECV. ID Nr. 2, precum și variantele sale nativă sau artificială. De asemenea, atunci când se face referință la un fragment de secvență a proteinei CTLA4, termenul în cauză include nu doar

fragmentul secvenței SECV. ID Nr. 2, ci și fragmentele corespunzătoare ale secvenței din variantele nativă sau artificială.

Termenul «B7», așa cum este utilizat în prezenta invenție, dacă nu se specifică altfel, se referă la B7-1 și/sau B7-2; secvențele lor proteice specifice țin de secvențele cunoscute în stadiul actual al tehnicii. Se poate face referire la secvențele descrise în literatura de specialitate din stadiul anterior al tehnicii sau în baza de date GenBank, de exemplu, B7-1 (CD80, NCBI Gene ID: 941), B7-2 (CD86, NCBI Gene ID: 942).

Termenul «CE₅₀», așa cum este utilizat în invenția de față, se referă la o concentrație care are 50% din efectul maxim, adică concentrație asigurând 50% din efectul maxim.

Termenul „anticorp”, așa cum este utilizat în prezenta invenție, se referă la o moleculă de imunoglobulină, care este formată, de regulă, din două perechi de lanțuri polipeptidice (fiecare pereche având lanțul „ușor” (L) și lanțul „greu” (H)). Lanțurile ușoare ale anticorpului pot fi clasificate ca κ și λ lanț ușor. Lanțurile grele pot fi clasificate ca μ , δ , γ , α sau ϵ , și izotipele anticorpilor sunt definite ca IgM, IgD, IgG, IgA și IgE, respectiv. În interiorul lanțului ușor și al lanțului greu regiunea variabilă și regiunea constantă se leagă prin regiunea „J”, formată din aproximativ 12 sau mai mulți aminoacizi, iar lanțul greu cuprinde suplimentar regiunea „D” constând din aproximativ 3 sau mai mulți aminoacizi. Fiecare lanț greu constă dintr-o regiune variabilă a lanțului greu (V_H) și o regiune constantă a lanțului greu (C_H). Regiunea constantă a lanțului greu este compusă din trei domenii (C_{H1}, C_{H2} și C_{H3}). Fiecare lanț ușor este format dintr-o regiune variabilă a lanțului ușor (V_L) și o regiune constantă a lanțului ușor (C_L). Regiunea constantă a lanțului ușor constă din domeniul C_L. Regiunea constantă a anticorpului poate intermedia legarea imunoglobulinei cu țesuturile sau factorii organismului gazdă, inclusiv cu diferite celule ale sistemului imunitar (de exemplu, cu celulele efectoare) și cu prima componentă a sistemului complement clasic (C1q). Regiunile V_H și V_L pot fi divizate suplimentar în regiuni cu o variabilitate mare (denumite regiuni de determinare a complementarității (CDR-uri)), în regiuni separate, denumite regiuni cadru (FR), care sunt relativ conservative. Fiecare V_H sau V_L este compus din 3 CDR-uri și 4 FR, aranjate în următoarea ordine începând de la capătul amino-terminal spre capătul carboxi-terminal: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Regiunile variabile (V_H și V_L) ale fiecărei perechi de lanț greu/lanț ușor formează situsul de legare la antigen, respectiv. Atribuirea aminoacizilor la fiecare regiune sau domeniu se efectuează în conformitate cu definiția dată de către Kabat - Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 și 1991)), sau de către Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917; Chothia și colab. (1989) Nature 342: 878-883. Termenul „anticorp” nu se limitează la vreun procedeu concret de obținere a anticorpului. De exemplu, acesta include, în particular, anticorpi recombinanți, anticorpi monoclonali și anticorpi policlonali. Anticorpii pot reprezenta anticorpi de diferite izotipe, cum sunt anticorpii IgG (de exemplu, subtipurile IgG1, IgG2, IgG3 sau IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE sau IgM.

Termenul „fragment de legare la antigen” a unui anticorp, așa cum este utilizat aici, se referă la o polipeptidă cuprinzând un fragment de anticorp cu dimensiunea completă, care păstrează capacitatea de a se lega în mod specific la un antigen cu care se leagă acest anticorp cu dimensiunea completă și/sau de a concura cu acest anticorp de dimensiune completă pentru legarea specifică la antigen. De asemenea, acest fragment este denumit „porțiune de legare la antigen”. Descrierea generală a se vedea în cartea Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., Second Edition, Raven Press, N.Y. (1989)). Fragmentele de anticorpi de legare la antigen pot fi obținute prin intermediul tehnologiei ADN recombinante sau prin scindarea enzimatică sau chimică a anticorpilor intacti. În unele cazuri, fragmentele de legare la antigen includ fragmentele Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb, fragmentul regiunii de determinare a complementarității, anticorpul cu un singur lanț (de exemplu, scFv), anticorpul himeric, diacorpul și astfel de polipeptide care conțin cel puțin o porțiune dintr-un anticorp, suficientă pentru a conferi acestei polipeptide capacitatea de a se lega în mod specific la antigen.

Termenul „Fd-fragment”, așa cum este utilizat aici, se referă la un fragment de anticorp care constă din domeniul V_H și domeniul C_{H1}; termenul „Fv-fragment” se referă la un fragment de anticorp care constă din domeniul V_L și domeniul V_H ale unui singur braț al unui anticorp; termenul „dAb-fragment” se referă la un fragment de anticorp care constă din domeniul V_H (Ward și colab., Nature 341: 544-546 (1989)); termenul „Fab-fragment” se referă la un fragment de anticorp care constă din domeniile V_L, V_H, C_L și C_{H1}; și termenul „F(ab')₂-fragment” se referă la un fragment de anticorp constând din două Fab-fragmente, asociate prin punți disulfurice la regiunea „balama”.

În unele cazuri, fragmentul de legare la antigen al anticorpului reprezintă un anticorp cu un singur lanț (de exemplu, scFv), în care domeniile V_L și V_H sunt asociate între ele printr-un element de legare (linker), care asigură obținerea unui singur lanț polipeptidic cu formarea unei molecule monovalente (a se vedea, de exemplu, Bird și colab., Science 242: 423-426 (1988) și Huston și colab., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 85: 5879-5883 (1988)). Asemenea molecule scFv pot avea o structură comună $\text{NH}_2\text{-V}_\text{L}\text{-linker-V}_\text{H}\text{-COOH}$ sau $\text{NH}_2\text{-V}_\text{H}\text{-linker-V}_\text{L}\text{-COOH}$. Linkerii indicați, cunoscuți din stadiul tehnicii, constau din secvența de aminoacizi repetitivă GGGGS sau din variantele acesteia. De exemplu, poate fi utilizat un agent de legare având secvența de aminoacizi (GGGGS)₄, însă, de asemenea, pot fi utilizate și variantele sale (Holliger și colab. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448). Alți linkeri adecvați pentru a fi utilizați în prezenta invenție sunt descriși în Alfthan și colab. (1995) Protein Eng. 8: 725-731; Choi și colab. (2001) Eur. J. Immunol. 31: 94-106; Hu și colab. (1996) Cancer Res. 56: 3055-3061; Kipriyanov și colab. (1999) J. Mol. Biol. 293: 41-56 și Roovers și colab. (2001) Cancer Immunol.

În unele cazuri, fragmentul de legare la antigen al anticorpului este un diacorp (anticorp bivalent), în care domeniile V_H și V_L sunt exprimate pe un singur lanț polipeptidic. Cu toate acestea, linkerul utilizat este prea scurt și aceste două domenii nu pot forma pe același lanț o pereche unul cu celălalt, fiind forțate să se imperecheze cu un domeniu complementar pe un alt lanț. Datorită acestui fapt, se formează doua situsuri de legare la antigen (vezi, de exemplu, Holliger P. și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) și Poljak R.J. și colab., Structure 2: 1121-1123 (1994)).

Fragmentele de legare la antigen ale anticorpilor (de exemplu, fragmentele de anticorpi indicate mai sus) pot fi derivate din anticorpii menționați (de exemplu, anticorpul monoclonal 8D2, descris în invenția de față), folosind metode standard, cunoscute specialiștilor în domeniu (de exemplu, prin tehnologii ADN recombinante sau procedee de clivaj enzimatic sau chimic), și pot fi supuse testării la specificitate prin aceleași procedee ca și anticorpii intacti.

În prezenta invenție, dacă din ontext nu reiese în mod clar altceva, termenul „anticorp” include nu doar anticorpii intacti, dar și fragmentele de legare la antigen ale anticorpilor.

Termenul „mAb” sau „anticorp monoclonal”, așa cum este utilizat în invenția de față, se referă la un anticorp sau la un fragment de anticorp dintr-un grup de molecule de anticorpi în cel mai înalt grad omogene, și anume, anticorpii separați, care constituie grupul, sunt identici, cu excepția unor posibile mutații apărute în mod natural. Anticorpii monoclonali sunt înalt specifici în raport cu un epitop al antigenului. Spre deosebire de anticorpii monoclonali, preparatele anticorpilor policlonali includ, de regulă, cel puțin două sau mai multe tipuri de diferiți anticorpi care recunosc diferiți epitopi ai antigenului. De regulă, anticorpii monoclonali pot fi preparați utilizând tehnologia hibridoma, descrisă pentru prima dată în Kohler și colab. (Nature, 256: 495, 1975), sau pot fi obținuți folosind tehnologia ADN recombinanți (vezi, de exemplu, brevetul US Nr. 4816567).

În prezenta invenție, anticorpul monoclonal numerotat este identic cu anticorpul monoclonal obținut din hibridomul cu același număr. De exemplu, anticorpul monoclonal 8D2 este identic cu anticorpul obținut din linia de celule hibridoma 8D2 sau din subclonele sale, sau din celule fiice.

Termenul „anticorp hibrid”, așa cum este utilizat în această invenție, se referă la un asemenea anticorp, în care o porțiune a lanțului ușor și/sau a lanțului greu este obținută dintr-un singur anticorp (care poate fi preparat dintr-o anumită specie sau aparține unei clase sau subclase concrete de anticorpi), în timp ce cealaltă parte a lanțului ușor și/sau a lanțului greu este obținută dintr-un alt anticorp (care poate fi derivată dintr-o specie identică sau diferită, sau aparținând unei clase sau subclase identice sau diferite de anticorpi), cu condiția că acesta își păstrează capacitatea de legare la antigenul țintă (Brevetul US Nr. 4816567, eliberat pe numele Cabilly și colab.; Morrison și colab., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)).

Termenul „anticorp umanizat”, utilizat în prezenta invenție, se referă la un anticorp sau un fragment de anticorp obținut după înlocuirea tuturor sau a câtorva CDR-uri ale unei imunoglobuline umane (anticorp recipient) cu CDR-uri ale unui anticorp non-uman (anticorp donor), în care anticorpul donor poate reprezenta un anticorp non-uman (de exemplu, de șoarece, de șobolan sau de iepure) cu specificitatea, afinitatea sau reactivitatea dorite. În afară de aceasta, unele resturi de aminoacizi ale regiunilor cadru (FR) ale anticorpului recipient pot fi înlocuite cu resturi aminoacide respective de anticorp non-uman sau cu resturi de aminoacizi ale altor anticorpi, cu scopul de a îmbunătăți în continuare sau de a optimiza caracteristicile anticorpului. Mai multe informații despre anticorpii umanizați a se vedea, de exemplu, la Jones și colab., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann și colab., Nature, 332: 323-329 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992); și Clark, Immunol. Today 21: 397-402 (2000).

Termenul „anticorp de neutralizare”, așa cum este utilizat în invenția propusă, se referă la un anticorp sau la un fragment de anticorp care este capabil de a elimina sau de a reduce în mod semnificativ virulența virusului țintă (de exemplu, capacitatea sa de a infecta celulele).

Termenul „epitop”, așa cum este utilizat în această descriere, se referă la o porțiune de antigen care se leagă într-un mod specific cu o imunoglobulină sau cu un anticorp. În domeniul de referință al tehnicii, „epitopul” mai este denumit și „determinant antigenic”. De regulă, epitopul sau determinantul antigenic constă din grupuri de suprafață ale moleculei chimic active, cum ar fi, de exemplu, din aminoacizi sau

compuși de carbohidrați sau din catene laterale de carbohidrați și, de regulă, deține caracteristici specifice de structură tridimensională și caracteristici specifice de sarcină. De exemplu, în mod obișnuit epitopul include cel puțin 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 sau 15 aminoacizi consecutivi sau neconsecutivi într-o conformație spațială determinată de către distanța dintre ei. Acesta poate fi un epitop „liniar” sau „conformațional”. A se vedea, de exemplu, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996). Într-un epitop liniar, toate punctele de interacțiune dintre proteină și molecula care interacționează (de exemplu, un anticorp) sunt amplasate în mod liniar pe secvența primară de aminoacizi a proteinei. În epitopul conformațional punctele care interacționează sunt formate din punți asociate de resturi aminoacide de proteine, îndepărtate una față de cealaltă.

Termenul „izolat”, așa cum este utilizat în invenția propusă, înseamnă obținut din stare nativă pe cale artificială. În cazul în care substanța sau componentul „izolat” se regăsește în natură, este posibil ca mediul său natural să fi fost modificat sau substanța să fi fost izolată din mediul său natural, sau și una, și alta. De exemplu, polinucleotidele neizolate sau polipeptidele se regăsesc în natură în organismele vii în vivo, iar polinucleotidele și polipeptidele identice de o puritate înaltă, derivate din astfel de stare naturală, sunt descrise ca fiind „izolate”. Termenul „izolat” nu exclude existența unui amestec de substanțe artificiale sau sintetice, precum și prezența altor impurități care nu afectează activitatea substanței.

Termenul „sistem de expresie *E. coli*”, așa cum este utilizat în invenția de față, se referă la un sistem de expresie care constă din *E. coli* (tulpină) și un vector în care *E. coli* (tulpină) a fost obținută, de exemplu, din tulpinile disponibile comercial, dar fără a se limita la acestea, GI698, ER2566, BL21 (DE3), B834 (DE3) și BLR (DE3).

Termenul „vector”, așa cum este utilizat în invenția propusă, se referă la un sistem purtător de acid nucleic în care poate fi încorporată o polinucleotidă. Atunci când vectorul permite exprimarea proteinei codificate de polinucleotida integrată, vectorul în cauză este denumit vector de expresie. Vectorul poate fi introdus în celula gazdă prin transformare, transducție sau transfecție în așa mod, încât componenta genetică care se conține în acest vector se exprimă în celula gazdă. Vectorii bine cunoscuți specialiștilor în domeniul de referință includ, fără a se limita la acestea, plasmidă, fagemidă, cosmidă, cromozomul artificial, cum ar fi cromozomul artificial al drojdiei (YAC), cromozomul artificial bacterian (BAC) sau cromozomul artificial pe bază de P1-plasmidă bacteriană (PAC); bacteriofag, cum ar fi fagul λ sau fagul M13, precum și virusul animal și altele similare. Virusurile animale care pot fi utilizate în calitate de vector includ, fără a se limita la acestea, retrovirusul (inclusiv lentivirusul), adenovirusul, virusul adenovirus asociat, virusul herpetic (de exemplu, virusul herpes simplex), poxvirusul, baculovirusul, virusul papiloma, papovavirusul (de exemplu, SV40). Vectorul poate conține mai multe componente pentru controlul expresiei, incluzând, fără a se limita la acestea, secvența-promotor, secvența de inițiere a transcripției, secvența amplificatoare, componenta de reproducție și gena reporter. În plus, vectorul poate cuprinde, de asemenea, situsul de inițiere a replicării.

Așa cum este utilizat aici, termenul „celula gazdă” se referă la celulele care pot fi utilizate pentru introducerea vectorului. Celulele în cauză includ, fără a se limita la acestea, celule procariote, cum ar fi *E. coli* sau *Bacillus subtilis*, celule de fungi, cum ar fi celulele de drojdie sau *Aspergillus*, celule de insecte, cum ar fi celulele *Drosophila S2* sau *Sf9*, sau celule animale, cum ar fi fibroblastele, celulele CHO, celulele COS, celulele NSO, celulele HeLa, celulele BHK, celulele HEK 293 sau celulele umane.

Termenul „identitate”, așa cum este utilizat în invenția de față, este folosit pentru a descrie coincidența secvenței dintre două polipeptide sau dintre doi acizi nucleici. Atunci când pozițiile corespunzătoare din cele două secvențe comparate sunt ocupate de către subunități monomerice similare (aminoacizi sau baze) (de exemplu, ambele poziții corespunzătoare din cele două molecule de ADN sunt ocupate de către adenină sau ambele poziții corespunzătoare din cele două polipeptide sunt ocupate de către lizină), moleculele în cauză aflate în această poziție sunt identice. „Identitatea procentuală” dintre două secvențe reprezintă următoarea funcție: numărul de poziții care coincid pentru cele două secvențe, împărțit la numărul de poziții comparate, înmulțit cu 100. De exemplu, dacă 6 din 10 poziții în două secvențe coincid, atunci aceste două secvențe au o identitate de 60%. De exemplu, ADN-ul secvențelor CTGACT și CAGGTT au identitatea de 50% (un total coincid trei din șase poziții). De regulă, două secvențe sunt comparate după nivelare, pentru a obține o identitate maximă. De exemplu, este convenabil ca o astfel de nivelare să fie efectuată cu ajutorul unui program de calculator, de exemplu, cu programul ALIGN (DNASTar, Inc.), prin procedeul descris în Needleman și colab. (1970) J. Mol. Biol. 48: 443-453. Totodată, algoritmul E. Meyers și W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4: 11-17 (1988)), încorporat în programul ALIGN (versiunea 2.0) poate fi utilizat pentru a determina identitatea procentuală dintre două secvențe de aminoacizi folosind tabelul de greutate pentru substituția resturilor PAM120, penalizarea pentru extinderea decalajului 12 și penalizarea pentru extinderea decalajului 4. În afară de aceasta, algoritmul Needleman și Wunsch (J. Mol. Biol. 48: 444-453 (1970)), încorporat în programul GAP din pachetul GCG (disponibil pe site-ul www.gcg.com), poate fi utilizat pentru a determina identitatea

procentuală dintre două secvențe de aminoacizi folosind matricea Blossum 62 sau matricea PAM250, greutatea decalajului 16, 14, 12, 10, 8, 6 sau 4 și greutatea continuării decalajului 1, 2, 3, 4, 5 sau 6.

Termenul de „substituție conservatoare”, așa cum este folosit în prezenta invenție, se referă la substituțiile de aminoacizi care nu afectează în mod negativ sau nu modifică proprietățile esențiale ale proteinei/poliipeptidei ce cuprinde secvența dată de aminoacizi. De exemplu, substituțiile conservatoare pot fi administrate prin intermediul unor tehnici standard, cunoscute din stadiul tehnicii, cum ar fi mutageneza situs-direcționată, mutageneză mediată prin tehnologia PCR. Substituțiile conservatoare de aminoacizi includ substituțiile în care restul de aminoacid este înlocuit cu un rest de aminoacid având o catenă laterală similară, de exemplu, cu un rest analogic cu restul de aminoacid corespunzător din punctul de vedere al proprietăților fizice sau al funcției (de exemplu, având dimensiunea, forma, încărcătura, proprietățile chimice similare, inclusiv capacitatea de a forma o legătură covalentă sau o legătură de hidrogen, sau altele de acest gen). Familiile de resturi de aminoacizi având catene laterale similare sunt definite în stadiul relevant al tehnicii. Aceste familii includ aminoacizi cu catenă laterală bazică (de exemplu, lizina, arginina și histidina), catenă laterală acidă (de exemplu, acidul aspartic și acidul glutamic), catenă laterală polară neîncărcată (de exemplu, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirozina, cisteina și triptofanul), catenă laterală nepolară (de exemplu, alanina, valina, leucina, izoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), catenă laterală beta ramificată (de exemplu, treonina, valina și izoleucina) și catenă laterală aromatică (de exemplu, tirozina, fenilalanina, triptofanul, histidina). Astfel, este preferabilă substituția restului de aminoacid corespunzător cu un alt rest de aminoacid din aceeași familie a catenei laterale. Procedeele de identificare a substituțiilor conservatoare de aminoacizi sunt bine cunoscute în stadiul tehnicii (de văzut, de exemplu, Brummell și colab., *Biochem.*, 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi și colab., *Protein Eng.* 12(10): 879-884 (1999); și Burks și colab., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 412-417 (1997) care sunt încorporate în invenția de față prin referință).

Termenul „imunogenitate”, așa cum este utilizat aici, se referă la capacitatea de a stimula organismul să producă anticorpi specifici sau să sensibilizeze limfocitele. Acesta se referă nu numai la proprietățile antigenului, care poate stimula celulele imune concrete în asemenea mod, încât să inducă activarea, proliferarea și diferențierea celulelor imune și în cele din urmă - producerea de substanțe efectoare imune, cum ar fi anticorpii, și care poate sensibiliza limfocitele, referindu-se, de asemenea, și la reacțiile specifice imune ale sistemului imunitar al organismului, care induc producerea de anticorpi sau de limfocite T sensibilizate, ca rezultat al stimulării organismului de către antigen. Imunogenitatea constituie cea mai importantă proprietate a antigenului. Capacitatea antigenului de a induce cu succes un răspuns imun în organismul gazdă depinde de trei factori: natura antigenului, reactivitatea organismului gazdă și procedeul de imunizare.

Termenul „legare specifică”, așa cum este folosit în prezenta invenție, se referă la o reacție nealeatoare de legare dintre două molecule, cum ar fi reacția dintre anticorp și antigenul țintă. În unele variante de realizare a invenției, legarea specifică a anticorpului la antigen (sau anticorpul este specific în raport cu antigenul) înseamnă că anticorpul se leagă la antigen cu o afinitate (K_D) de mai puțin de aproximativ 10^{-5} M, de exemplu, mai puțin de aproximativ 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M sau 10^{-10} M, sau mai puțin.

Termenul „ K_D ”, utilizat în lucrarea de față, se referă la constanta echilibrului de disociere a unei interacțiuni particulare anticorp-antigen care este folosit pentru a descrie afinitatea legării dintre anticorp și antigen. Cu cât e mai mică constanta echilibrului de disociere, cu atât este mai puternică legarea anticorpului la antigen și cu atât este mai înaltă afinitatea dintre anticorp și antigen. De regulă, anticorpul (de exemplu, anticorpul monoclonal 8D2 conform invenției de față) se leagă la antigen (de exemplu, la proteina L1) cu constantă echilibrului de disociere (K_D) mai mică de aproximativ 10^{-5} M, de exemplu, mai mică de aproximativ 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M sau 10^{-10} M, sau și mai mică, de exemplu, așa cum este determinat prin intermediul rezonanței plasmonice de suprafață (SPR) pe un dispozitiv BIACORE.

Termenii „anticorp monoclonal” și „mAb”, așa cum sunt utilizați în invenția de față, au unul și aceeași semnificație și pot fi folosiți în mod intersanjabil. De asemenea, termenii „anticorp policlonal” și „pAb” au una și aceeași semnificație și pot fi folosiți în mod intersanjabil. De asemenea, termenii „polipeptidă” și „proteină” au unul și aceeași semnificație și pot fi folosiți în mod intersanjabil. În afară de aceasta, în prezenta invenție aminoacizii sunt marcați, de regulă, prin abrevieri formate dintr-o singură literă sau din trei litere, bine cunoscute în domeniul respectiv al tehnicii. De exemplu, o alanină poate fi notată ca A sau ca Ala.

Termenii „hibridoma” și „linie celulară hibridoma”, așa cum sunt utilizați aici, pot fi folosiți în mod intersanjabil. De asemenea, atunci când se face referire la termenul „hibridoma” sau la termenul „linie celulară hibridoma”, acesta include, de asemenea, subclone și celule fiice ale liniei celulare hibridoma 4B3.

Termenul „vector acceptabil farmaceutic și/sau excipient”, așa cum este utilizat în invenția propusă, se referă la vectorul și/sau la excipientul compatibil cu subiectul și cu componenta activă în farmacologie și/sau fiziologie, fiind bine cunoscute în stadiul respectiv al tehnicii (a se vedea, de exemplu, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995), și include, fără a se limita la acestea, un agent de ajustare a pH-ului, un agent activ de suprafață, un adjuvant, un amplificator de intensitate ionică. De exemplu, agentul de ajustare a pH-ului include, fără a se limita la acesta, un tampon fosfat; agentul activ de suprafață include, fără a se limita la acesta, un agent activ de suprafață cationic, anionic sau neionic, cum ar fi, de exemplu, Tween 80; și un amplificator de intensitate ionică include, fără a se limita la aceasta, clorură de sodiu.

Termenul „adjuvant”, așa cum este utilizat în invenția de față, se referă la un amplificator nespecific de imunitate care poate spori răspunsul imun al organismului la un antigen sau poate schimba tipul de răspuns imun atunci când este administrat în organism împreună cu un antigen sau înainte de administrarea unui antigen. Există mai mulți adjuvanți incluzând, fără limitare la aceștia, adjuvanții de aluminiu (de exemplu, hidroxidul de aluminiu), adjuvantul Freund (de exemplu, adjuvantul Freund complet și adjuvantul Freund incomplet), lipopolizaharidul *Corynebacterium parvum*, citokina și altele asemenea. În prezent, adjuvantul Freund este utilizat cel mai frecvent în experimentele pe animale, iar hidroxidul de aluminiu este folosit pe scară largă în cadrul studiilor clinice.

Termenul „cantitate eficientă”, așa cum este utilizat aici, se referă la o cantitate suficientă pentru a realiza sau, cel puțin, pentru a atinge parțial efectele dorite. De exemplu, termenul „cantitate eficientă din punct de vedere profilactic” pentru o afecțiune (de exemplu, pentru o boală asociată cu legarea excesivă a CTLA4 la B7 sau cu activitatea CTLA4, cum ar fi o tumoră) se referă la o cantitate suficientă pentru prevenirea, suprimarea sau încetinirea progresiei bolii (de exemplu, a unei boli asociate cu excesul activității de legare a CTLA4 la B7 sau a activității CTLA4, cum ar fi o tumoră); iar termenul „cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic” pentru o boală se referă la o cantitate suficientă pentru a vindeca sau a stopa, cel puțin parțial, boala și complicațiile sale la un pacient care suferă de această boală. Determinarea unei asemenea cantități eficiente ține de competența specialiștilor din domeniul respectiv al tehnicii. De exemplu, o cantitate eficientă din punct de vedere terapeutic va depinde de severitatea bolii care este tratată, starea generală a sistemului imunitar al pacientului, starea generală a pacientului, cum ar fi vârsta, greutatea corporală și sexul, calea de administrare a agentului, precum și de alte tipuri de terapie, realizate simultan, și altele asemenea.

Efectul util al invenției

Anticorpus monoclonal 8D2 și anticorpii săi umanizați conform prezentei invenții se pot lega foarte bine și în mod specific la CTLA4. Dintre aceștia, anticorpii 8D2 și 8D2(Re) se leagă la antigenul CTLA4 murin cu un randament de legare mai bun decât cel al anticorpilor de control 10D1 (Alan J. Korman, Edward L. Halk, și colab., HUMAN CTLA-4 ANTIBODIES, US Patent No. US6984720B1) și 11.2.1 (Douglas Charles Hanson, Mark Joseph Neveu, și colab., Human monoclonal antibodies to CTLA-4, US Patent No. US682736B1). Anticorpus umanizat 8D2H1L1 se leagă la antigenul murin CTLA4 cu o eficiență de legare mai bună decât cea a anticorpului de control 10D1 și comparabilă cu cea a anticorpului 11.2.1. Anticorpus umanizat 8D2H2L2 se leagă la antigenul CTLA4 uman cu o eficiență comparabilă cu cea a anticorpului 10D1. Anticorpii umanizați 8D2H2L2 și 8D2H3L3 se leagă la antigenul CTLA4 simian cu o eficiență de legare comparabilă cu cea a anticorpului 10D1. Anticorpii 8D2H2L15 și 8D2H2L17 se leagă la antigenul uman CTLA4 cu o eficiență mai bună decât cea a anticorpilor de control 10D1 și 11.2.1.

Anticorpii 8D2, 8D2(Re) și anticorpii umanizați 8D2, 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 pot concura cu B7 pentru legarea la antigenul CTLA4. Dintre aceștia, 8D2, 8D2(Re), 8D2H1L1 și 8D2H2L2 concurează cu B7-2 mai puternic decât 10D1 pentru legarea la CTLA4; și 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 concurează mai puternic cu B7-1 și B7-2 decât anticorpii 10D1 și 11.2.1 pentru legarea la CTLA4.

Anticorpus monoclonal 8D2 și anticorpii săi umanizați conform prezentei invenții pot bloca legarea CTLA4 la B7, în particular, facilitând imunosupresia organismului de către CTLA4 și activând limfocitele T cu un grad înalt de eficiență. Dintre aceștia, 8D2H2L2 și 8D2H2L15 activează limfocitele T mai puternic decât anticorpii de control 10D1 și 11.2.1.

Descrierea succintă a figurilor

Figura 1. Rezultatele electroforezei SDS-PAGE a proteinei de fuziune CTLA4ECD-mFc. Probele și cantitățile acestora încărcate în 4 benzi de la stânga la dreapta: M, marker, 10 μ l; proteină de fuziune CTLA4ECD-mFc, 1 μ g; proteină de fuziune CTLA4ECD-M mFc, 2 μ g; proteină de fuziune CTLA4ECD-mFc, 3 μ g.

Figura 2. Rezultatele electroforezei SDS-PAGE a anticorpului 8D2. Probele și cantitățile încărcate ale acestora în 4 benzi de la stânga la dreapta: M, marker, 10 μ l; probă de anticorp în tamponul reducător

de încărcare pentru electroforeza proteinei, 0,3 µg; tampon nereducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 2 µl; probă de anticorp în tamponul reducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 0,3 µg.

Figura 3. Rezultatele electroforezei SDS-PAGE a anticorpului recombinant 8D2 (8D2(Re)). Probele și cantitățile încărcate ale acestora în 4 benzi de la stânga la dreapta: M, marker 10 µl; probă de anticorp în tamponul reducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 1 µg; tampon nereducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 2 µl; probă de anticorp în tamponul nereducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 1 µg.

Figura 4. Rezultatele electroforezei SDS-PAGE anticorpului recombinant 8D2, 8D2H1L1. Probele și cantitățile încărcate în 4 benzi de la stânga la dreapta: M, marker, 10 µl; probă de anticorp în tamponul reducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 1 µg; tampon nereducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 2 µl; probă de anticorp în tamponul nereducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 1 µg.

Figura 5. Rezultatele electroforezei SDS-PAGE a anticorpului recombinant 8D2, 8D2H2L2. Probele și cantitățile încărcate în 4 benzi de la stânga la dreapta: M, marker, 10 µl; probă de anticorp în tamponul reducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 1 µg; tampon reducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 2 µl; probă de anticorp în tamponul nereducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 1 µg.

Figura 6. Rezultatele electroforezei SDS-PAGE a anticorpului recombinant 8D2, 8D2H3L3. Probele și cantitățile încărcate în 4 benzi de la stânga la dreapta: M, marker, 10 µl; probă de anticorp în tamponul reducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 1 µg; tampon nereducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 2 µl; probă de anticorp în tamponul nereducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 1 µg.

Figura 7. Rezultatele electroforezei SDS-PAGE a anticorpului recombinant 8D2, 8D2H2L15. Probele și cantitățile încărcate ale acestora: M, marker, 10 µl; probă de anticorp în tamponul nereducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 1 µg; probă de anticorp în tamponul reducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 1 µg.

Figura 8. Rezultatele electroforezei SDS-PAGE a anticorpului recombinant 8D2, 8D2H2L17. Probele și cantitățile aplicate ale acestora: M, marker, 10 µl; probă de anticorp în tamponul nereducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 1 µg; probă de anticorp în tamponul reducător de încărcare pentru electroforeza proteinei, 1 µg.

Figura 9. Rezultatele determinării parametrilor dinamici caracteristici ai mAb 8D2.

Figura 10. Rezultatele determinării parametrilor dinamici caracteristici ai 8D2H1L1.

Figura 11. Rezultatele determinării parametrilor dinamici caracteristici ai 8D2H2L2.

Figura 12. Rezultatele determinării parametrilor dinamici caracteristici ai 8D2H3L3.

Figura 13. Rezultatele determinării parametrilor dinamici caracteristici ai 8D2H2L15.

Figura 14. Rezultatele determinării parametrilor dinamici caracteristici ai 8D2H2L17.

Figura 15. Histograma care indică expresia CTLA4 pe celulele nemarcate 293F, în controlul izotipic și celulele 293F-CTLA4, după cum s-a stabilit prin intermediul citometriei în flux continuu (numărul de celule - fluorescența (FITC)).

Figura 16. Intensitatea medie a fluorescenței (MFI) a expresiei CTLA4 pe celulele nemarcate 293F, pe controalele izotipice și celulele 293F-CTLA4, după cum s-a stabilit prin intermediul citometriei în flux continuu.

Figura 17. Rezultatele EC₅₀ de legare a anticorpului mAb 8D2 la celulele marcate 293F-CTLA4.

Figura 18. Rezultatele EC₅₀ de legare a anticorpului 8D2 (Re) la celulele marcate 293F-CTLA4.

Figura 19. Rezultatele EC₅₀ de legare a anticorpului 8D2H1L1 la celulele marcate 293F-CTLA4.

Figura 20. Rezultatele EC₅₀ de legare a anticorpului 8D2H2L2 la celulele marcate 293F-CTLA4.

Figura 21. Rezultatele EC₅₀ de legare a anticorpului 8D2H3L3 la celulele marcate 293F-CTLA4.

Figura 22. Determinarea legării anticorpilor 8D2, 8D2H1L1 și 8D2(Re) la CTLA4 folosind testul ELISA.

Figura 23. Determinarea legării anticorpilor recombinanți 8D2H2L2 și 8D2H3L3 la CTLA4 uman folosind testul ELISA.

Figura 24. Determinarea legării anticorpilor recombinanți 8D2H2L2 și 8D2H3L3 la CTLA4 simian folosind testul ELISA.

Figura 25. Determinarea legării anticorpilor recombinanți 8D2H2L15 și 8D2H2L17 la CTLA4 simian folosind testul ELISA.

Figura 26. Rezultatele testului ELISA la determinarea concurenței anticorpilor 8D2, 8D2H1L1 și 8D2(Re) cu B7-1.

Figura 27. Rezultatele testului ELISA la determinarea concurenței anticorpilor 8D2, 8D2H1L1 și 8D2(Re) cu B7-2.

Figura 28. Rezultatele testului ELISA la determinarea concurenței anticorpilor 8D2H2L2 și 8D2H3L3 cu B7-1.

5 Figura 29. Rezultatele testului ELISA la determinarea concurenței anticorpilor 8D2H2L2 și 8D2H3L3 cu B7-2.

Figura 30. Rezultatele testului ELISA la determinarea concurenței anticorpilor 8D2H2L15 și 8D2H2L17 cu B7-1.

10 Figura 31. Rezultatele testului ELISA la determinarea concurenței anticorpilor 8D2H2L15 și 8D2H2L17 cu B7-2.

Figura 32. Influența asupra nivelului secreției de IL-2 de către limfocitele T, determinată prin intermediul testului ELISA, după co-cultivarea timp de 72 de ore cu celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC), celulele Raji și anticorpii umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2 sau 8D2H3L3, respectiv. Rezultatele demonstrează faptul că anticorpii umanizați mAb 8D2 sporesc secreția de IL-2 de către limfocitele T prin blocarea receptorului CTLA4.

15 Figura 33. Influența asupra nivelului secreției de IL-2 de către limfocitele T, determinată prin intermediul testului ELISA, după co-cultivarea timp de 72 de ore cu celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC), celulele Raji și anticorpii umanizați 8D2H2L15 sau 8D2H2L17, respectiv. Rezultatele demonstrează faptul că anticorpii umanizați mAb 8D2 sporesc secreția de IL-2 de către limfocitele T prin blocarea receptorului CTLA4.

20 Figura 34. Curba creșterii tumorii, a probei transplantate subcutanat hu-SCID-Raji, care a primit tratament cu 8D2H2L2.

Exemple concrete de realizare a invenției

25 Variantele de realizare a prezentei invenții vor fi descrise în continuare în mod detaliat, cu referință la Exemple. Specialiștii în domeniul respectiv al tehnicii vor aprecia faptul că următoarele Exemple sunt destinate ca să ilustreze prezenta invenție. Exemplele, pentru care nu sunt descrise procedee sau condiții concrete, au fost realizate prin utilizarea procedeeelor și condițiilor descrise în literatura din domeniul respectiv al tehnicii (de exemplu, J. Sambrook și colab., tradus de către Peitang HUANG și colab., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Science Press) sau în conformitate cu instrucțiunile produselor. Reactivii și instrumentele, ai căror furnizori nu sunt indicați, reprezintă produse convenționale, disponibile în comerț.

În următoarele Exemple ale prezentei invenții șoarecii liniei BALB/C au fost achiziționați de la Guangdong Medical Laboratory Animal Center.

35 În următoarele Exemple ale prezentei invenții limfocitele T au fost primite de la Akeso Biopharma Inc., Zhongshan.

Anticorpus de control 10D1 a fost obținut după cum este descris în brevetul US Nr.6984720B1; și anticorpus 11.2.1 a fost obținut după cum este descris în brevetul US Nr.6682736B1.

Exemplul 1. Obținerea CTLA4-8D2 al liniei de celule hibridoma LT001 și obținerea anticorpusului monoclonal 8D2

40 CTLA4 recombinant a fost exprimat în sistemul de expresie a celulelor de mamifere pentru imunizarea cu ajutorul acestuia a șoarecilor în calitate de antigen, iar celulele hibridoma au fost preparate prin fuziunea celulelor splenice de șoarece cu celule de mielom. Linia de celule hibridoma (CTLA4-8D2 linie de celule hibridoma LT001) a fost obținută în urma screeningului unui număr mare de probe. Respectiva linie de celule putea secreta anticorpus monoclonal 8D2, care se leagă în mod specific la CTLA4. Procedeele specifice sunt descrise în continuare.

1. Sinteza genei CTLA4ECD-mFc

50 În conformitate cu schema structurii proteinei de fuziune (SECV. ID Nr. 3), secvența de aminoacizi (SECV. ID Nr. 2), care corespunde fragmentului extracelular al genei CTLA4 (antigenul 4 NCBI asociat cu T-limfocitele citotoxice al genei ID 1493, SECV. ID Nr. 1) (CTLA4ECD) a fost fuzionat cu fragmentul de Fc-proteină de IgG (mFc) murin, în care mFc constituie un fragment de Fc-proteină a IgG murin cu secvența de aminoacizi prezentată sub formă de parte accentuată a SECV. ID Nr. 3.

Pentru a spori eficiența expresiei genei țintă în sistemul de expresie celulară 293f, secvența de nucleotide, care codifică secvența de proteină din SECV. ID Nr. 3, a fost optimizată în Genscript Co., luându-se în considerare, în principal, asemenea factori cum ar fi codonii preferențiali, conținutul de GC, structura secundară a mARN și secvențele repetitive. Gena finală optimizată, care codifică proteina de fuziune CTLA4ECD-mFc, a avut următoarea secvență (SECV. ID Nr. 4) și a fost sintetizată în Genscript Co.

Secvența genei CTLA4ECD (375 bp):

GCAATGCACGTGGCCCAGCCTGCTGTGGTACTGGCCAGCAG
 CCGAGGCATCGCCAGCTTTGTGTGTGAGTATGCATCTCCAGGCA
 AAGCCACTGAGGTCCGGGTGACAGTGCTTCGGCAGGCTGACAG
 CCAGGTGACTGAAGTCTGTGCGGCAACCTACATGATGGGGAAT
 GAGTTGACCTTCCTAGATGATTCCATCTGCACGGGGCACCTCCAG
 TGGAAATCAAGTGAACCTCACTATCCAAGGACTGAGGGCCATGG
 ACACGGGACTCTACATCTGCAAGGTGGAGCTCATGTACCCACCG
 CCATACTACCTGGGCATAGGCAACGGAACCCAGATTTATGTAAT
 TGATCCAGAACCGTGCCAGATTCTGAC (SEQ ID NO: 1)

Secvența proteinei, codificată de către CTLA4ECD (125 aa):

AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS
 QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDT
 GLYICKVELMYPPPYLIGIGNGTQIYVIDPEPCPDS (SEQ ID NO:
 2)

- 5 Secvența proteinei de fuziune CTLA4ECD-mFc (364 aa), în care o porțiune a CTLA4ECD este
 evidențiată printr-o linie ondulată, iar o porțiune a mFc este evidențiată cu o linie aldină.

AMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS
QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDT
GLYICKVELMYPPPYLIGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDENLYFQGPRG
PTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVS
EDDPDVOISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHOD
WMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEM
TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGS
YFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
 (SEQ ID NO: 3)

Secvența de codificare a genei, corespunzătoare proteinei de fuziune CTLA4ECD-mFc (1092 bp),
 în care o porțiune a CTLA4ECD este evidențiată cu o linie ondulată, iar o porțiune a mFc este evidențiată
 cu o linie aldină.

GCAATGCATGTCGCACAGCCTGCAGTGGTCCTGGCAAGCTC
CAGGGGAATCGCTAGCTTCGTGTGCGAATACGCTTCCCCAGGCA
AGGCAACCGAGGTCCGGGTGACAGTCCTGAGACAGGCCGACAG
CCAGGTGACAGAAGTCTGCGCCGCTACTTATATGATGGGCAACG
AGCTGACCTTTCTGGACGATAGCATTGTACCGGGACATCTAGT
GGAAACCAAGTGAATCTGACCATCCAGGGCCTGCGCGCTATGG
ACACAGGGCTGTACATTTGTAAAGTGGAGCTGATGTATCCCCCT
CCATACTATCTGGGAATCGGCAACGGGACCCAGATCTACGTGAT
TGATCCTGAACCATGCCCCGACTCCGATGAGAATCTGTATTTC
AGGGACCACGAGGCCCCACAATTAAGCCATGTCCCCCTTGCAA
TGTCCTGCACCAAACCTGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTTCATCTT
TCCACCCAAGATCAAGGACGTGCTGATGATCTCACTGAGCCCCA
TTGTGACCTGCGTGGTCGTGGACGTGAGCGAGGACGATCCTGA
TGTGCAGATCAGTTGGTTCGTCAACAATGTGGAAGTCCACACAG
CTCAGACTCAGACCCATAGGGAGGATTACAATAGTACTCTGCGC
GTCGTGTCAGCACTGCCCATTCAGCACCAGGACTGGATGAGCG
GCAAGGAGTTCAAGTGCAAAGTGAACAACAAGGATCTGCCCCG
ACCTATCGAGAGAACTATTTCCAAGCCTAAAGGGTCTGTGAGGG
CCCCACAGGTGTATGTCCTGCCTCCACCCGAGGAAGAGATGACT
AAGAAACAGGTGACACTGACTTGTATGGTCACCGACTTCATGCC
CGAAGATATCTACGTGGAGTGGACTAACAATGGGAAGACCGAA
CTGAACTATAAAAATACAGAGCCTGTGCTGGACTCAGATGGAAG
CTACTTTATGTATAGCAAGCTGCGAGTGGAAGAGAAAACTGGG
TGCAGCGGAACAGCTACTCTTGTAGTGTGGTCCACGAAGGGCTG
CATAATCACACACCACTAAATCATTCTCCCGAACTCCAGGCAA

A (SEQ ID NO: 4)

2. Prepararea plasmidului pUC57simple-CTLA4ECD-mFc

Gena de fuziune CTLA4ECD-mFc sintetizată (SECV. ID Nr. 4) a fost clonată în vectorul de expresie pUC57simple (furnizat de către Genscript Co.) în cadrul Genscript Co., obținând plasmidul pUC57simple-CTLA4ECD-mFc.

3. Construirea plasmidului recombinant pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc

Plasmidul pUC57simple-CTLA4ECD-mFc a fost scindat cu ajutorul endonucleazelor XbaI și BamHI. Un fragment al proteinei de fuziune CTLA4ECD-mFc a fost izolat prin intermediul electroforezei și ligat în vectorul de expresie pcDNA3.1 (achiziționat de la Invitrogen Co.). Plasmidul obținut pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc a fost utilizat pentru a transfecta celulele competente *E. coli* ale tulpinii DH5a (achiziționate de la TIANGEN Co.). Transfecția și cultivarea au fost efectuate în conformitate cu instrucțiunile respective. Coloniile *E. coli*, pozitive conform pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc, au fost selectate și replicate prin mijloace convenționale. Apoi, plasmidul recombinant a fost extras cu ajutorul unui kit de reactivi (procurat de la Tiangen Biotech (Beijing) Co. LTD, DP103-03) în conformitate cu instrucțiunile atașate la kitul în cauză.

4. Celulele 293F (achiziționate de la Invitrogen Co.) au fost transfectate prin intermediul plasmidului recombinant pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc folosind kitul de reactivi pentru transfecția Lipofectamine (achiziționat de la Invitrogen Co.).

5. Peste șapte zile după transfecția celulelor 293F cu plasmidul recombinant pcDNA3.1-CTLA4ECD-mFc, proteina de fuziune CTLA4ECD-mFc a fost izolată din lichidul de cultură prin intermediul centrifugării de mare viteză, filtrării în vid printr-o membrană microporoasă de filtrare și cu cromatografie pe o coloană de HiTrap cu proteina A CP. După purificare, probele au fost colectate, apoi încărcate în tamponul reducător pentru electroforeza proteinei și analizate prin intermediul electroforezei SDS-PAGE. După cum se demonstrează în Figura 1, proteina țintă este vizibilă sub forma unei zone de

10 mobilitate electroforetică cu o masă de aproximativ 45 kDa.

6. Prepararea CTLA4-8D2 al liniei de celule hibridoma LT001

Utilizând proteina de fuziune CTLA4ECD-mFc în calitate de imunogen, celulele hibridoma au fost obținute prin fuzionarea celulelor splenice de soareci imunizați ce țin de linia BALB/C (achiziționați de la Guangdong Medical Laboratory Animal Center) cu celule de mielom murine conform unui protocol standard (de exemplu, Stewart, S.J., „Monoclonal Antibody Production”, în Basic Methods in antibody Production and Characterization, Eds G.C. Howard și D.R. Bethell, Boca Raton: CRC Press, 2000). CTLA4 a fost folosit în calitate de antigen pentru acoperirea plăcii ELISA, iar celulele hibridoma, care secretă noi anticorpi ce se leagă în mod specific la CTLA4, erau obținute prin screening cu ajutorul metodei indirecte ELISA. Liniile de celule hibridoma, care secretă anticorpi monoclonali și concurează cu

15 ligandul B7-1 (CD80, NCBI Gene ID 941) sau cu ligandul B7-2 (CD86, NCBI Gene ID 942) pentru legarea la CTLA4, au fost obținute prin screening, folosind metoda competitivă ELISA, din celule hibridoma, obținute la etapa de screening cu ajutorul metodei indirecte ELISA. Linia celulară hibridoma stabilă a fost preparată prin diluție limitativă. Linia de celule hibridoma a fost denumită linie de celule hibridoma CTLA4-8D2 și această linie celulară stabilă CTLA4-8D2 a fost preparată prin diluție limitativă

20 (desemnată în invenția de față și ca LT001; anticorpul monoclonal, secretat de această linie, a fost desemnat ca 8D2).

7. Prepararea anticorpului 8G2

Linia de celule CTLA4-8D2 (LT001) din prezenta invenție a fost cultivată într-un mediu suplimentat cu ser bovin fetal de 10% cu un nivel scăzut de IgG. După șapte zile, supernatantul de cultură

30 celulară a fost colectat pentru purificarea anticorpului 8G2.

8. Determinarea anticorpilor 8G2 prin electroforeză SDS-PAGE

Probele purificate au fost adăugate în tamponul reducător de încărcare pentru electroforeza proteică și în tamponul nereducător de încărcare pentru electroforeza proteică. După fierbere, a fost efectuată detectarea. Rezultatele demonstrează că proteina țintă este vizibilă sub forma a două zone de

35 mobilitate electroforetică cu masa de aproximativ 50 kDa și 25 kDa pentru proba de proteină din tamponul reducător, sau sub forma unei zone de mobilitate electroforetică cu masa de aproximativ 150 kDa pentru proba de proteină din tamponul nereducător (Figura 2).

Exemplul 2. Determinarea secvențelor lanțului ușor și lanțului greu ale anticorpului monoclonal 8D2

Urmând instrucțiunile referitoare la kitul de reactivi pentru RT-PCR al sistemului de sinteză a primului lanț SuperScript® III (Invitrogen), a fost sintetizat ADNc, amplificat cu ajutorul PCR. Produsul de amplificare PCR a fost supus imediat TA-clonării în conformitate cu instrucțiunile referitoare la kitul de reactivi pentru clonare pEASY-T1 (TransGen, Cat. No. CT101). Produsele TA-clonării au fost imediat secvențiate, rezultatele secvențierii fiind prezentate în continuare.

45 Rezultatele secvențierii ADN-ului regiunii variabile a lanțului greu (345 pb):

GAGGTGAAACTGGACGAAACTGGCGGGGGGCTGGTGCAGC
 CCGGACGACCTATGAAGCTGTCATGCGTCGCCAGCGGCTTCACC
 TTTAGCGACAACTGGATGAATTGGGTGAGGCAGAGCCCAGAGA
 AGGGGCTGGAATGGCTGGCTCAGATCCGCAACAAACCCTACAAT
 TATGAGACCTACTATTCTGACAGTGTGAAGGGCCGGTTCACAAT
 TTCCAGAGACGATTCTAAAAGCTCCGTCTACCTGCAGATGAACA
 ATCTGAGAGGGCGAAGATATGGGGATCTACTATTGCACAGCACAG
 TTCGCTTATTGGGGACAGGGCACTCTGGTCACAGTCTCCGCC
 (SEQ ID NO: 5)

Secvența de proteină codificată de aceasta (115 aa):

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDNWMNWVRQSP
 EGGLEWLAQIRNKPYNYYETYSVSKGRFTISRDDSKSSVYLQMNN
 LRGEDMGIYYCTAQFAYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 6)

Rezultatele secvențierii ADN-ului regiunii variabile a lanțului ușor (318 pb):

GACATTCAGATGACACAGAGTCCTGCTTCCCTGAGTGCCTC
 AGTGGGGGAGACCGTCACAATCACTTGCGGCACCTCTGAAAACA
 TCTACGGCGGGCTGAATTGGTATCAGCGGAAGCAGGGCAAAAG
 TCCCCAGCTGCTGATCTTCGGAGCAACAAACCTGGCCGACGGCA
 TGAGCTCCCGGTTTAGCGGGTCCGGATCTGGCAGACAGTACAG
 CCTGAAGATTTCTAGTCTGCACCCAGACGATGTGGCTACTTACT
 ATTGCCAGAATGTCCTGAGGAGTCCCTTCACCTTTGGGTCAGGA
 ACAAAGCTGGAGATC (SEQ ID NO: 7)

Secvența de proteină codificată de aceasta (106 aa):

DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGTSENIYGGLNWFYQRKQGKS
 PQLLIFGATNLADGMSSRFSGSGRQYSLKISLHPDDVATYYCQN
 VLRSPFTFGSGTKLEI (SEQ ID NO: 8)

Exemplul 3. Designul secvențelor lanțului ușor și lanțului greu ale anticorpilor umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17

În baza structurii cristaline tridimensionale a proteinei CTLA4 (Nat. Struct. Biol. (1997) 4, p. 527) și a secvențelor anticorpului 8D2, obținut în Exemplul 2, structura anticorpului a fost modelată pe calculator. Secvențele regiunii variabile a anticorpilor 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 au fost construite pe baza secvențelor anticorpului și modelului structural (secvențele regiunii constante a anticorpului au fost luate din baza de date NCBI). Secvențele regiunii variabile sunt prezentate în continuare.

1. Secvențele lanțului ușor și lanțului greu ale anticorpului monoclonal 8D2H1L1

Secvența de ADN a regiunii variabile a lanțului greu (345 bp):

GAAGTGCAGCTGGTTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGCAGC
CAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACC
TTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTCAGGCAGGCACCAGGAA
AGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAACAAACCTTACAA
CTACGAAACTTACTACAGCGACTCCGTGAAGGGGGCGGTTACCA
TTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGTGTGTACCTGCAGATGAAT
AGCCTGAAGACCGAGGATACAGGAGTCTACTATTGTACCGCACA
GTTTGCTTATTGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA
(SEQ ID NO: 9)

Secvența de proteină codificată de aceasta(115 aa):

EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAP
KGKLEWLAQIRNKPYNLYETYYSDSVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNS
LKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 10)

Secvența de ADN a regiunii variabile a lanțului ușor (321 bp):

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCAAGCCTGTCCGCATC
TGTGGGCGACCGAGTCACCATCACATGCAGAACCTCCGAGAACA
TCTACGGCGGGCTGAATTGGTATCAGCGAAAGCAGGGGAAAAG
TCCCAAGCTGCTGATCTACGGGGCAACAAACCTGGCCAGCGGA
ATGAGCTCCAGATTCAGTGGATCAGGCAGCGGGACAGATTATAC
TCTGAAAATTTCTAGTCTGCACCCAGACGATGTGGCAACCTACT
ATTGCCAGAATGTCCTGAGGTCACCCTTCACCTTTGGAAGCGGC
ACAAAACCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 11)

Secvența de proteină codificată de aceasta (107 aa):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYGGLNHWYQRKQGKS
PKLLIYGATNLAAGMSSRFSGSGSGTDYTLKISSLHPDDVATYYCQN
VLRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 12)

2. Secvențele lanțului ușor și lanțului greu 8D2 ale anticorpului monoclonal umanizat 8D2H2L2

Secvența de ADN a regiunii variabile a lanțului greu (345 bp):

GAAGTGCAGCTGGTTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGCAGC
CAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCACC
TTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTCAGGCAGGCACCAGGAA
AGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAACAAACCTTACAA
CTACGAAACTTACTACAGCGCCTCCGTGAAGGGGGCGGTTACCA
TTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGTGTGTACCTGCAGATGAAT
AGCCTGAAGACCGAGGATACAGGAGTCTACTATTGTACCGCACA
GTTTGCTTATTGGGGGCAGGGCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA
(SEQ ID NO: 13)

Secvența de proteină codificată de aceasta (115 aa):

**EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAP
GKGLEWLAQIRNKPYN YETYYASVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNS
LKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 14)**

Secvența de ADN a regiunii variabile a lanțului ușor (321 bp):

**GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCAAGCCTGAGTGCCTC
AGTGGGAGACCGGGTCACCATCACATGCAGAACCAGCGAGAAC
ATCTACGGCGGCCTGAACTGGTATCAGCGAAAGCCAGGCAAGA
GCCCCAAGCTGCTGATCTACGGGGCAACCAACCTGGCCTCTGGA
GTGAGCTCCAGATTCAGCGGCAGCGGCTCTGGGACCGACTATA
CTCTGACCATTCTAGTCTGCAGCCTGAAGATGTGGCAACATAC
TATTGCCAGAATGTCCTGAGGTCCCCATTACCTTTGGATCTGG
CACCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 15)**

Secvența de proteină codificată de aceasta (107 aa):

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSENIYGGLN WYQRKPGKSP
KLLIYGATNLAGSVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQNV
LRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 16)**

5

3. Secvențele lanțului ușor și lanțul greu ale 8D2 anticorpului monoclonal umanizat 8D2H3L3
Secvența de ADN a regiunii variabile a lanțului greu (345 bp):

**GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGAGGCGGCCTGGTGCAGC
CCGGCGGGTCACTGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGGCTTCAC
CTTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTGAGGCAGGCACCCGGG
AAGGGGCTGGAGTGGGTGCGCTCAGATCCGCAACAAACCTTACA
ATTATGAGACAGAATACGCAGCCTCTGTGAAGGGGCGGTTCACT
ATTAGTAGAGACGATAGCAAGAACAGCGCCTATCTGCAGATGAA
TAGCCTGAAGACCGAAGATACAGCCGTCTACTATTGTACAGCTC
AGTTTGCATACTGGGGCCAGGGAACCTCTGGTGACCGTCAGCTCC
(SEQ ID NO: 17)**

10

Secvența de proteină codificată de aceasta (115 aa):

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDNWMNWVRQAPG
KGLEWVAQIRNKPYN YET EYAASVKGRFTISRDDSKNSAYLQMNSL
KTEDTAVYYCTAQFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 18)**

Secvența de ADN a regiunii variabile a lanțului ușor (321 bp):

GACATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCTTCTGTCCGCATCT
 GTGGGAGACCGGGTCACCATCACATGCAGAGCCAGCGAGAACA
 TCTACGGCGGCCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGGCAAAGC
 TCCCAAGCTGCTGATCTACGGAGCAACCTCCCTGGCATCTGGAG
 TGCCATCCCGGTTTCAGTGGATCAGGCAGCGGGACCGACTATACT
 CTGACCATTAGCTCCCTGCAGCCTGAAGACTTCGCCACATACTA
 TTGCCAGAACGTGCTGAGGTCCCCATTACCTTTGGATCTGGCA
 CCAAGCTGGAGATCAAG (SEQ ID NO: 19)

Secvența de proteină codificată de aceasta (107 aa):

DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASENIYGGLNWDYQKPGKA
 PKLLIYGATSLASGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQNV
 LRSPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 20)

4. Secvențele lanțului ușor și lanțului greu ale 8D2 anticorpului monoclonal umanizat 8D2H2L15
 Secvența de ADN a regiunii variabile a lanțului greu (345 bp):

GAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGC
 AGCCAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGG
 CTTACCTTCAGCGACAACTGGATGAATTGGGTCAGGCAGG
 CACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAA
 CAAACCTTACAACCTACGAACTTACTACAGCGCCTCCGTGA
 AGGGGCGGTTACCATTTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGT
 GTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAGACCGAGGATACAGG
 AGTCTACTATTGTACCGCACAGTTTGCTTATTGGGGGCGAGG
 GCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 13)

Secvența de proteină codificată de aceasta (115 aa):

EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVR
 QAPGKGLEWLAQIRNKPYNLYETYYASVKGRFTISRDDSKNSV
 YLQMNSLKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID
 NO: 14)

Secvența de ADN a regiunii variabile a lanțului ușor (321 bp):

**GACATCCAGATGACTCAGTCTCCCAGCTCCCTGTCCGC
TTCTGTGGGCGATCGGGTCACTATCACCTGTAGAACCAGCG
AGAACATTTACGGCGGACTGAATTGGTATCAGAGGAAGCCC
GGGAAAAGTCCTAAGCTGCTGATCTACGGAGCAACAAACCT
GGCCTCCGGCGTGTCTAGTCGCTTCAGTGGATCAGGCAGCG
GGACCGACTATACACTGACTATTTCAAGCCTGCAGCCAGAG
GATGTGGCCACATACTATTGCCAGAATGTCCTGAGCCGGCA
CCCCGGATTTGGCTCAGGGACCAAACCTGGAAATTAAG (SEQ
ID NO: 21)**

Secvența de proteină codificată de aceasta (107 aa):

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRTSENIYGGLNWFYQKRP
GKSPKLLIYGATNLSGVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT
YYCQNVLSRHPGFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 22)**

5. Secvențele lanțului ușor și lanțului greu ale 8D2 anticorpului monoclonal umanizat 8D2H2L17
Secvența de ADN a regiunii variabile a lanțului greu (345 bp):

**GAAGTGCAGCTGGTTCGAGTCCGGGGGGGGCCTGGTGC
AGCCAGGAGGATCAATGCGACTGAGCTGCGCCGCTTCCGG
CTTCACCTTCAGCGACAACCTGGATGAATTGGGTCAGGCAGG
CACCAGGAAAGGGACTGGAGTGGCTGGCACAGATCCGCAA
CAAACCTTACAACCTACGAACTTACTACAGCGCCTCCGTGA
AGGGGCGGTTACCATTCTAGAGACGATTCTAAAAACAGT
GTGTACCTGCAGATGAATAGCCTGAAGACCGAGGATACAGG
AGTCTACTATTGTACCGCACAGTTTGCTTATTGGGGGCAGG
GCACTCTGGTGACAGTCTCTTCA (SEQ ID NO: 13)**

Secvența de proteină codificată de aceasta (115 aa):

**EVQLVESGGGLVQPGGSMRLSCAASGFTFSDNWMNWVR
QAPGKGLEWLAQIRNKPYNLYETYYASVKGRFTISRDDSKNSV
YLQMNSLKTEDTGVYYCTAQFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID
NO: 14)**

10 Secvența de ADN a regiunii variabile a lanțului ușor (321 bp):

GACATCCAGATGACTCAGTCACCCAGCTCCCTGAGTG
 CTTTCAGTGGGCGATCGGGTCACTATCACCTGTAGAACCAGC
 GAGAACATTTACGGCGGACTGAATTGGTATCAGAGGAAGCC
 CGGGAAAAGCCCTAAGCTGCTGATCTACGGAGCAACAAACC
 TGGCCTCCGGCGTGTCTAGTCGCTTCAGCGGCAGCGGCTCT
 GGAACCGACTATACACTGACTATTTCAAGCCTGCAGCCAGA
 GGATGTGGCCACATACTATTGCCAGAATGTCCTGTCCTCTC
 GACCCGGATTGTCAGTGGGACCAAACTGGAAATTAAG
 (SEQ ID NO: 23)

Secvența de proteină codificată de aceasta (107 aa):

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRTSENIYGGLNWKYQRP
 GKSPKLLIYGATNLSGVSSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVAT
 YYCQNVLSRPGFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 24)

Exemplul 4. Prepararea anticorpului recombinant 8D2, 8D2(Re) și 8D2 anticorpilor umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 și detectarea lor prin intermediul electroforezei SDS-PAGE

1. Prepararea 8D2 anticorpului recombinant, 8D2(Re) și detectarea lor prin intermediul electroforezei SDS-PAGE

Secvența de ADNc a lanțului greu (secvența regiunii sale variabile este prezentată în SECV. ID Nr. 5) și secvența de ADNc a lanțului ușor (secvența regiunii sale variabile este prezentată în SECV. ID Nr. 7) a anticorpului 8D2 au fost clonate în vectorul pUC57simple (furnizat de către Genscript Co.), respectiv, obținând plasmidul pUC57simple-8D2H și plasmidul pUC57simple-8D2L.

Plasmidele pUC57simple-8D2H și pUC57simple-8D2L au fost scindate cu endonucleaze (HindIII și EcoRI), respectiv. Fragmentele care codifică lanțul greu și lanțul ușor, izolate prin intermediul electroforezei, au fost subclonate în mod individual în vectorul pcDNA3.1. Plasmidele recombinante au fost extrase și cu ajutorul lor au fost co-transfectate celulele 293F. După șapte zile de cultivare a celulelor, lichidul de cultură a fost supus procesului de ultracentrifugare, filtrare în vid printr-un filtru cu membrană microporoasă și purificare pe o coloană HiTrap cu proteină A HP. Probele purificate au fost adăugate într-un tampon reducător de încărcare pentru electroforeza proteinei și într-un tampon nereducător de încărcare pentru electroforeza proteinei. După fierbere, a fost realizată detectarea prin intermediul electroforezei SDS-PAGE. După cum se arată în Figura 3, proteina țintă este vizibilă sub forma a două benzi de mobilitate electroforetică cu masa de aproximativ 50 kDa și 25 kDa pentru proba de proteină din tamponul reducător, sau în sub formă de zone de mobilitate electroforetică cu masa de aproximativ 150 kDa pentru proba de proteină din tamponul nereducător.

2. Prepararea 8D2 anticorpilor umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2 și 8D2H3L3, și detectarea lor prin electroforeza SDS-PAGE

Secvențele de ADNc ale lanțului greu (secvențele regiunilor lor variabile sunt prezentate în SECV. ID Nr. 9, SECV. ID Nr. 13, SECV. ID Nr. 17, SECV. ID Nr. 13, SECV. ID Nr. 13, respectiv) și secvențele de ADNc ale lanțului ușor (secvențele regiunilor lor variabile sunt prezentate în SECV. ID Nr. 11, SECV. ID Nr. 15, SECV. ID Nr. 19, SECV. ID Nr. 21, SECV. ID Nr. 23, respectiv) ale anticorpilor 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 au fost clonate în vectorul pUC57simple (furnizat de către Genscript Co.), respectiv, fiind obținute plasmidele pUC57simple-8D2H1L1, pUC57simple-8D2H2L2, pUC57simple-8D2H3L3, pUC57simple-8D2H2L15 și pUC57simple-8D2H2L17. Aceste plasmide au fost subclonate separat în vectorul pcDNA3.1 utilizând procedeul descris mai sus pentru 8D2(Re).

Prin intermediul plasmidelor recombinante au fost co-transfectate celulele 293F. Lichidul de cultură de la celulele 293F a fost supus detectării după purificarea sa prin procedeul descris mai sus pentru 8D2(Re). Rezultatele sunt prezentate în Figura 4, Figura 5, Figura 6, Figura 7 și Figura 8. Proteina țintă este vizibilă sub forma a două benzi de mobilitate electroforetică cu masa de aproximativ 50 kDa și 25 kDa pentru probele de proteină din tamponul reducător, sau sub formă de zonă de mobilitate electroforetică cu masa de aproximativ 150 kDa pentru probele de proteină din tamponul nereducător.

Anticorpul recombinant 8D2, 8D2(Re) și 8D2 anticorpii umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17, utilizați în exemplele care urmează, au fost preparați în conformitate cu procedeul descris în acest exemplu.

Exemplul 5: Determinarea parametrilor dinamici ai anticorpilor

Parametrii dinamici de legare a anticorpului 8D2 și anticorpilor umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2 și 8D2H3L3 la antigenul CTLA4 (NCBI Gene ID: 1493 cu secvența nucleotidică de codificare, prezentată în SECV. ID Nr. 25, și cu secvența de aminoacizi codificată, prezentată în SECV. ID Nr. 26) au fost determinate folosind analizorul de interacțiune moleculară ForteBio.

1. Proteina CTLA4-mFc (CTLA4-mFc a fost preparată în același mod ca cel descris în Exemplul 1 pentru sinteza CTLA4ECD-mFc) a fost scindată cu protează TEV, iar antigenul CTLA4 a fost obținut prin purificare pe coloană.

Secvența genei CTLA4 (636 bp):

**ATGGGCGTCCTGCTGACTCAGAGAACCCTGCTGTCCCTGGT
GCTGGCACTGCTGTTTCCTTCAATGGCTTCAATGGCTATGCATG
TGGCTCAGCCAGCAGTGGTCCTGGCAAGCTCCAGGGGGATCGC
CAGTTTCGTGTGCGAGTACGCCTCACCTGGAAAGGCTACAGAAG
TCCGGGTGACTGTCCTGAGACAGGCTGACTCTCAGGTGACCGA
GGTCTGCGCCGCTACATATATGATGGGCAACGAACTGACCTTTC
TGGACGATTCCATTTGTACTGGCACCTCTAGTGGGAACCAAGTG
AATCTGACTATCCAGGGACTGCGAGCAATGGACACCGGACTGTA
CATTTGCAAAGTGGAGCTGATGTATCCCCCTCCATACTATCTGG
GCATCGGGAATGGAACACAGATCTACGTGATTGATCCCGAACCT
TGTCCAGACAGCGATTTCTGCTGTGGATTCTGGCAGCCGTGTC
AAGCGGCCTGTTCTTTTATAGCTTTCTGCTGACTGCCGTCTCCCT
GTCTAAGATGCTGAAGAAACGATCCCCCTGACCACAGGGGTG
GTCGTGAAAATGCCACCTACCGAGCCCGAGTGCGAAAAACAGTT
CCAGCCATACTTTATCCCTATCAAT (SEQ ID NO: 25)**

Secvența corespunzătoare de aminoacizi codificată cu aceasta (212 aa):

**MGVLLTQRTLTLVLALLFSPMASMAMHVAQPAVVLASSRGI
ASFVCEYASPGKATEVRVTVLRLQADSQVTEVCAATYMMGNELTFL
DDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIG
NGTQIYVIDPEPCPDSDFLWLAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLK
KRSPLTTGVVVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN (SEQ ID NO: 26)**

2. Anticorpul 8D2 și anticorpii săi umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 au fost imobilizați pe suprafața senzorului AR2G prin legarea aminoacizilor, fiind blocați cu etanolamină. După echilibrare, în PBS (tampon fosfat salin) a fost adăugat antigenul CTLA4 pentru legare. CTLA4 a fost diluat de 2 ori în serie în PBS, după care s-au obținut următoarele concentrații: 300, 150, 75, 37,5, 18,75, 9,38, 4,69, 0 nM. Disocierea a avut loc în TFS. Detectarea anticorpilor umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 a fost efectuată după același procedeu ca și 8D2, și concentrațiile de antigen au constituit 180, 90, 45, 22,5, 11,25, 5,625, 2,813, 0 nM.

Parametrii dinamici ai anticorpului 8D2 și anticorpilor săi umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 sunt prezentați în Tabelul 1, iar rezultatele determinării parametrilor caracteristicilor dinamice sunt prezentate în Figurile 9-14, respectiv.

Tabelul 1

Parametrii dinamici ai anticorpilor 8D2, 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17

Denumirea anticorpului	K_D (M)	k_{on} (1/Mc)	k_{on} Eroare	k_{dis} (1/c)	k_{dis} Eroare
8D2	1,66E-10	1,42E+05	1,22E+03	2,36E-05	2,09E-06
8D2H1L1	6,08E-10	3,40E+05	1,17E+04	2,07E-04	1,81E-05
8D2H2L2	9,55E-10	4,07E+05	1,59E+04	3,88E-04	1,60E-05
8D2H3L3	1,05E-09	3,12E+05	1,01E+04	3,27E-04	1,41E-05
8D2H2L15	1,02E-09	4,54E+05	8,18E+03	4,65E-04	9,50E-06
8D2H2L17	7,66E-10	4,59E+05	8,21E+03	3,52E-04	8,30E-06
10D1	1,21E-09	4,67E+05	1,15E+04	5,65E-04	1,51E-05
11.2.1	9,03E-10	3,87E+05	5,46E+03	3,49E-04	7,32E-06

5 K_D , constanta de afinitate; k_{on} , viteza de asociere antigen-anticorp; k_{dis} , viteza de disociere antigen-anticorp; $K_D = k_{dis}/K_{on}$.

Aceste rezultate demonstrează că toți cei șase anticorpi au o bună afinitate la antigen, comparabilă sau chiar mai mare decât afinitatea anticorpilor de control 10D1 și 11.2.1.

Exemplul 6. Determinarea activității anticorpilor privind legarea antigenului CTLA4 pe suprafața liniei celulare hibridoma cu ajutorul citometriei în flux continuu

În primul rând, au fost preparate celulele gazdă 293F, care exprimă antigenul CTLA4, și au fost marcate cu anticorpul monoclonal 8D2 (Exemplul 1), cu 8D2(Re) și cu 8D2 anticorpii umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2 și 8D2H3L3 (Exemplul 4), obținute în cadrul prezentei invenții, respectiv. În continuare, capacitatea anticorpilor de a se lega în mod specific la un antigen cu conformație nativă a fost evaluată pe suprafața celulelor prin citometrie în flux continuu.

Etapele specifice sunt prezentate în continuare.

1. Prepararea celulelor gazdă 293F, care exprimă antigenul CTLA4

Celulele 293F au fost transfectate cu plasmidul pLenti6.3-CTLA4 pentru CTLA4 (vectorul pLenti6.3 a fost achiziționat de la Invitrogen Co.) folosind un kit de reactivi pentru transfecția Lipofectamine (achiziționat de la Invitrogen Co.). După efectuarea screeningului a fost obținută o populație clonală de celule care exprimă în mod stabil CTLA4 (293F-CTLA4).

2. Marcarea anticorpilor și detectarea lor folosind un citometru în flux continuu

Celulele gazdă 293F, care exprimă antigenul CTLA4, obținute la etapele precedente, au fost tratate cu tripsină prin metoda obișnuită și un număr de 2×10^5 celule au fost adăugate în fiecare tub de colectare. Soluțiile diluate ale anticorpului 8D2 în PBS, conținând 1% BSA, au fost preparate pentru a obține o concentrație de 20 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM și 0 nM, respectiv. După incubarea pe un pat de gheață timp de 2 ore a celulelor 293F, care exprimă CTLA4, în fiecare tub s-au adăugat 100 μ l de FITC-ser de capră-antioarece IgG (1:500) și aceste tuburi au fost incubate pe patul de gheață timp de 1 oră. După adăugarea a 300 μ l de PBS, semnalul fluorescent a fost înregistrat folosindu-se canalul FITC al citometrului în flux continuu. Detectarea altor anticorpi a fost realizată în același mod ca și detectarea anticorpului 8D2.

3. Rezultate

Rezultatele privind evaluarea exprimării CTLA4 pe celulele 293F-CTLA4 sunt prezentate în Figura 15 și Figura 16, respectiv. Rezultatele legării anticorpilor 8D2, 8D2(Re) și a trei anticorpi umanizați la celulele 293F sunt prezentate în figurile 17-21, respectiv. După cum se demonstrează în aceste figuri, anticorpul 8D2 și anticorpii săi umanizați se pot lega în mod eficient la proteina țintă CTLA4 de pe suprafața celulelor gazdă 293F, eficacitate de legare a acestora având un caracter dependent de doză. Valorile intensității fluorescenței pentru fiecare doză sunt prezentate în Tabelul 2.

Eficacitatea de legare EC_{50} a anticorpului 8D2 și a anticorpilor săi umanizați a fost obținută utilizându-se curba de simulare în analiza cantitativă a fluorescenței anticorpului legat 8D2 și a anticorpilor săi umanizați, care este prezentată în Tabelul 3.

Tabelul 2

Analiza intensității fluorescenței, care determină legarea anticorpilor 8D2, 8D2(Re) și 8D2 anticorpilor umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2 și 8D2H3L3 la antigenul CTLA4 pe suprafața celulelor gazdă 293F-CTLA4, cu ajutorul citometriei în flux continuu.

	8D2	8D2(Re)	8D2H1L1	8D2H2L2	8D2H3L3
Concentrația (nM)	Intensitatea fluorescenței				
0,001	7,60	24,62	10,84	10,85	10,85
0,01	7,70	24,72	10,85	32,48	25,14
0,1	9,10	66,72	21,25	124,03	108,29
1	25,50	321,27	103,04	624,65	623,25
5	182,60	713,87	558,75	972,03	970,80
10	638,60	897,63	943,84	1159,24	1084,74
25	721,80	873,24	1170,64	1132,39	1091,77

Tabelul 3

Eficacitatea de legare EC_{50} a anticorpilor 8D2, 8D2(Re) și 8D2 anticorpilor umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2 și 8D2H3L3 la antigenul CTLA4 pe suprafața celulelor gazdă 293F-CTLA4, obținută utilizând curba de simulare în analiza cu citometrie în flux continuu

	8D2	8D2(Re)	8D2H1L1	8D2H2L2	8D2H3L3
EC_{50} (nM)	3,84	1,38	5,06	4,37	4,54

Aceste rezultate indică faptul că anticorpii 8D2, 8D2(Re) și 8D2 anticorpii umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2 și 8D2H3L3 cu toții au o capacitate foarte puternică de a se lega la antigenul CTLA4 de pe suprafața celulelor gazdă 293F-CTLA4.

Exemplul 7. Determinarea activității anticorpilor privind legarea antigenului CTLA4 cu ajutorul metodei ELISA

Placa ELISA a fost acoperită cu CTLA4 la temperatura de 4°C pe parcursul unei nopți. După blocarea cu BSA de 1% la temperatura de 37°C timp de 2 ore, s-a adăugat CTLA4 al anticorpului 8D2, 8D2(Re) și 8D2 anticorpii umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17, și anticorpii de control 10D1 (Alan J. Korman, Edward L. Halk, și colab., HUMAN CTLA-4 ANTIBODIES, Brevetul SUA Nr. US6984720B1) și 11.2.1 (Douglas Charles Hanson, Mark Joseph Neveu, și colab., Human monoclonal antibodies to CTLA-4, Brevetul SUA Nr. US682736B1) pentru reacționare timp de 30 minute. Anticorpul secundar conjugat cu enzimă a fost adăugat pentru incubare timp de 30 de minute. Apoi a fost determinată absorbanta la lungimea de undă de 450 nm pe cititorul pentru plăcile ELISA.

Rezultatele privind detectarea legării anticorpului 8D2 și a anticorpilor săi umanizați la antigenul CTLA4 sunt prezentate în Figurile 22-25, respectiv. După cum se demonstrează în aceste figuri, anticorpii 8D2, 8D2(Re) și 8D2 anticorpii umanizați cu toții se pot lega în mod eficient la proteina CTLA4, eficacitatea de legare a acestora fiind dependentă de doză. Valorile intensității fluorescenței pentru fiecare doză sunt prezentate în Tabelele 4-8. Eficacitatea de legare EC_{50} a anticorpilor 8D2, 8D2(Re) și anticorpilor umanizați a fost obținută folosind curba de simulare în analiza cantitativă a fluorescenței anticorpului legat 8D2, 8D2(Re) și anticorpilor umanizați (Tabelul 9).

Tabelul 4

Legarea 8D2 și 8D2(Re) la CTLA4 murină (ELISA)

Concentrația de anticorp (μg/ml)	Antigenul de acoperire: CTLA4 murin, 0,5 μg/ml					
	8D2	8D2(Re)	10D1			
1	2,823	2,682	2,672	2,769	2,995	2,975
0,3	2,806	2,763	2,690	2,735	2,852	2,900
0,1	2,754	2,718	2,796	2,685	2,429	2,538
0,03	2,336	2,381	2,305	2,259	1,507	1,704
0,01	1,614	1,560	1,397	1,446	0,673	0,794
0,003	0,784	0,760	0,662	0,674	0,292	0,328
0,001	0,358	0,355	0,315	0,321	0,136	0,142
0	0,063	0,052	0,053	0,046	0,046	0,050
Anticorpul secundar	Capră anti-murin Anticorp secundar			Capră anti-uman Anticorp secundar		

Tabelul 5

Legarea 8D2, 8D2H1L1 și 8D2(Re) la CTLA4 umană (ELISA)

Concentrația de anticorp (μg/ml)	Antigenul de acoperire: CTLA4 umană, 0,5 μg/ml									
	10D1		11.2.1		8D2H1L1		8D2		8D2(Re)	
1	3,479	3,432	3,584	3,547	3,016	3,031	3,029	3,107	3,058	3,085
1:3	3,323	3,155	3,499	3,479	2,834	2,904	3,076	3,074	2,930	3,072
1:9	2,506	2,293	3,211	3,187	2,610	2,670	2,878	2,988	2,805	2,868
1:27	1,331	1,194	2,337	2,293	1,834	1,944	2,265	2,287	2,052	2,064
1:81	0,552	0,528	1,254	1,267	0,969	0,996	1,335	1,479	1,398	1,271
1:243	0,202	0,222	0,536	0,552	0,450	0,515	0,666	0,770	0,634	0,649
1:729	0,141	0,115	0,253	0,263	0,204	0,206	0,277	0,351	0,307	0,309
0	0,090	0,086	0,072	0,064	0,067	0,067	0,064	0,067	0,071	0,086
Anticorpul secundar	IgG capră anti-uman Anticorp secundar						IgG capră anti-murin Anticorp secundar			

Tabelul 6

5

Legarea anticorpilor 8D2H2L2 și 8D2H3L3 la CTLA4 umană (ELISA)

Concentrația de anticorp (μg/ml)	Antigenul de acoperire: CTLA4 umană, 0,5 μg/ml							
	8D2H2L2		8D2H3L3		10D1		11.2.1	
1	1,489	1,411	1,631	1,601	1,775	2,069	2,206	2,150
1:3	1,178	1,262	1,192	1,455	1,527	1,480	1,825	2,047
1:9	0,710	0,872	0,943	1,007	1,073	1,204	1,292	1,409
1:27	0,336	0,370	0,642	0,658	0,663	0,585	0,893	0,682
1:81	0,192	0,195	0,415	0,374	0,349	0,323	0,499	0,426
1:243	0,097	0,109	0,230	0,214	0,132	0,146	0,223	0,219
1:729	0,075	0,083	0,100	0,130	0,099	0,099	0,127	0,136
0	0,052	0,055	0,052	0,057	0,056	0,053	0,057	0,061
Anticorpul secundar	IgG capră anti-uman conjugat cu HRP Anticorp secundar							

Tabelul 7

Legarea anticorpilor 8D2H2L2 și 8D2H3L3 la CTLA4 simiană (ELISA)

Concentrația de anticorp (μg/ml)	Antigenul de acoperire: CTLA4-hFc simiană, 0,25 μg/ml							
	8D2H2L2		8D2H3L3		10D1		11.2.1	
1	1,576	1,624	1,235	1,321	1,788	1,846	1,718	1,632
1:3	1,223	1,199	0,921	0,873	1,250	1,344	1,540	1,460
1:9	0,793	0,775	0,654	0,724	0,845	0,868	1,114	1,054
1:27	0,471	0,426	0,441	0,403	0,429	0,402	0,625	0,665
1:81	0,220	0,230	0,239	0,218	0,190	0,191	0,297	0,313
1:243	0,114	0,117	0,123	0,119	0,104	0,108	0,130	0,172
1:729	0,071	0,076	0,088	0,096	0,063	0,067	0,082	0,094
0	0,048	0,048	0,048	0,050	0,049	0,053	0,048	0,051
Anticorpul secundar	IgG capră anti-uman conjugat cu HRP, F(ab') ₂ Anticorp secundar							

10

Tabelul 8

Legarea anticorpilor 8D2H2L15 și 8D2H2L17 cu CTLA4 umană (ELISA)

Concentrația de anticorp (μg/ml)	Antigenul de acoperire: CTLA4, la 0,5 μg/ml											
	8D2H2L2 20150327		8D2H2L15		8D2H2L17		10D1		11.2.1		8D2H2L2 20140422	
1	2,34	2,37	2,58	2,55	2,61	2,81	2,56	2,74	2,75	2,69	2,23	2,40
1:3	2,22	2,09	2,65	2,72	2,73	2,78	2,42	2,44	2,56	2,66	2,09	2,07

1:9	2,03	1,87	2,79	2,45	2,59	2,73	2,20	2,20	2,69	2,44	1,92	1,95
1:27	1,82	1,93	2,43	2,21	2,41	2,28	1,81	1,70	2,13	2,28	1,47	1,63
1:81	1,10	1,17	1,95	1,83	1,80	1,68	1,03	1,09	1,37	1,53	1,10	1,01
1:243	0,65	0,58	1,05	1,02	1,14	1,19	0,51	0,53	0,75	0,79	0,49	0,50
1:729	0,26	0,21	0,53	0,44	0,57	0,50	0,21	0,24	0,32	0,31	0,23	0,20
0	0,04	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Anticorp secundar: IgG capră anti-uman conjugat cu HRP (1:5000)												

Tabelul 9

Eficacitatea de legare EC_{50} a anticorpilor 8D2, 8D2(Re) și 8D2 anticorpilor umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 la antigenul CTLA4, obținută prin intermediul curbei de simulare în analiza efectuată prin metoda ELISA

	Sursa de antigen CTLA4	Anticorpul EC_{50} (nM)	10D1 EC_{50} (nM)	11.2.1 EC_{50} (nM)
8D2	Șoarece	0,015	0,062	0,023
		0,071	0,24	
8D2(Re)	Șoarece	0,015	0,062	0,023
		0,085	0,24	
8D2H1L1	Șoarece	0,025	0,062	0,023
8D2H2L2	Om	0,12	0,125	0,09
8D2H2L2	Om	0,082	0,125	0,09
8D2H2L2	Om	0,118	0,125	0,09
8D2H3L3	Om	0,129	0,125	0,09
8D2H2L2	Maimuță	0,227	0,258	0,075
8D2H3L3	Maimuță	0,385	0,258	0,075
8D2H2L15	Om	0,042	0,138	0,075
8D2H2L17	Om	0,047	0,138	0,075

Notă: Anticorpul 8D2H2L2 a fost măsurat în trei repetitivități.

Rezultatele prezentate mai sus arată că anticorpul 8D2 și 8D2(Re) se leagă la antigenul murin CTLA4 cu o eficiență mai bună în comparație cu anticorpul de control 10D1 și 11.2.1. Anticorpul umanizat 8D2H1L1 se leagă la antigenul murin CTLA4 cu o eficiență mai mare în comparație cu anticorpul de control 10D1 și cu o eficiență comparabilă cu 11.2.1.

Anticorpul umanizat 8D2H2L2 se leagă la antigenul uman CTLA4 cu o eficiență comparabilă cu cea a eficienței de legare a 10D1. Anticorpul umanizat 8D2H2L2 și 8D2H3L3 se leagă la antigenul uman CTLA4 cu o eficiență comparabilă cu eficiența legării 10D1. Anticorpul umanizat 8D2H2L15 și 8D2H2L17 se leagă la antigenul uman CTLA4 cu o eficiență care depășește cu mult eficiența legării anticorpilor de control 10D1 și 11.2.1.

Exemplul 8. Determinarea activității anticorpilor privind concurența lor cu B7-1/2 pentru legarea la antigenul CTLA4 folosind testul de competitivitate ELISA

1. Determinarea activității anticorpilor privind concurența lor cu B7-1 pentru legarea la antigenul CTLA4 folosind testul ELISA

Plăcile ELISA au fost acoperite cu B7-1 la temperatura de 4°C pe parcursul unei nopți. După blocarea cu BSA de 1% la temperatura de 37°C timp de 2 ore, au fost adăugați anticorpul anti-CTLA4, adică anticorpul monoclonal 8D2, 8D2(Re) și 8D2 anticorpul umanizat 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17, precum și anticorpul de control 10D1 și 11.2.1. După incubarea timp de 10 minute, a fost adăugat CTLA4-mFc. După incubarea la temperatura de 37°C timp de 40 de minute, a fost adăugat anticorpul secundar conjugat cu enzimă. După incubarea la temperatura de 37°C timp de 30 minute, a fost determinată absorbanta la lungimea de undă de 450 nm pe cititorul plăcilor ELISA.

2. Determinarea activității anticorpilor privind concurența lor cu B7-2 pentru legarea la antigenul CTLA4 cu ajutorul testului ELISA

Plăcile ELISA au fost acoperite cu CTLA4-mFc la temperatura de 4°C pe parcursul unei nopți. După blocarea cu BSA de 1% la temperatura de 37°C timp de 2 ore, au fost adăugați anticorpul anti-CTLA4, adică anticorpul monoclonal 8D2, 8D2(Re) și 8D2 anticorpul umanizat 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17, precum și anticorpul de control 10D1 și 11.2.1. După incubarea timp de 10 minute, a fost adăugat B7-2. După incubarea la temperatura de 37°C timp de 40 minute, a fost adăugat anticorpul secundar conjugat cu enzimă. După incubarea la temperatura de 37°C timp de 30

minute, a fost determinată absorbanta la lungimea de undă de 450 nm pe cititorul plăcii ELISA. Rezultatele privind detectarea legării 8D2, 8D2(Re) și anticorpilor umanizați la antigenul CTLA4 sunt prezentate în Figurile 26-31, respectiv. După cum se demonstrează în aceste figuri, anticorpul 8D2, 8D2(Re) și 8D2 anticorpul umanizați se pot lega în mod eficient la proteina CTLA4, eficiența de legare a acestora fiind dependentă de doză. Valorile intensității fluorescenței pentru fiecare doză sunt prezentate în Tabelele 10-16. Eficacitate de legare EC₅₀ a anticorpilor 8D2, 8D2(Re) și a anticorpilor umanizați a fost obținută folosindu-se curba de simulare în analiza cantitativă a fluorescenței anticorpului legat 8D2, 8D2(Re) și anticorpilor umanizați (Tabelul 17).

10

Tabelul 10

Anticorpul 8D2 și 8D2(Re) concurează cu B7-1, testul ELISA

Concentrația de anticorp (μg/ml)	Antigenul de acoperire: CTLA4-mFc, 0,2 μg/ml			
	8D2		8D2(Re)	
3	0,163	0,149	0,176	0,215
1	0,208	0,188	0,200	0,214
0,3	0,354	0,347	0,355	0,390
0,1	0,680	0,695	0,668	0,721
0,03	1,378	1,262	1,430	1,708
0,01	1,758	1,612	1,630	1,824
0,003	1,982	1,711	1,890	1,937
0	2,228	1,766	1,805	1,779
B7/1-hFc (0,3 μg/ml)				
Anticorpul secundar	Anticorp secundar capră anti-uman			

Tabelul 11

Anticorpul 8D2, 8D2H1L1 și 8D2(Re) concurează cu B7-1, testul ELISA

Concentrația de anticorp (µg/ml)	Proteina de acoperire: B7/1- hFc, 0,2 µg/ml							
	10D1		11.2.1		8D2 H1L1		CTLA4-mFc (0,6 µg/ml) 1:2	
3	0,168	0,158	0,101	0,105	0,123	0,138	0,824	0,791
1:3	0,258	0,232	0,119	0,133	0,206	0,231	0,640	0,768
1:9	0,515	0,466	0,381	0,485	0,445	0,529	0,750	0,717
1:27	0,577	0,508	0,597	0,579	0,509	0,659	0,653	0,626
1:81	0,801	0,730	0,650	0,613	0,669	0,723	0,571	0,522
1:243	0,814	0,848	0,900	0,520	0,841	0,821	0,459	0,327
1:729	0,854	0,732	0,993	0,841	0,848	0,822	0,312	0,232
0	0,856	0,812	0,826	0,550	0,672	0,600	0,071	0,074
Antigenul	CTLA4-mFc 0,3 µg/ml						Controlul	
Anticorpul secundar	IgG capră anti-murin conjugat cu HRP Anticorp secundar							

15

Tabelul 12

Anticorpul 8D2, 8D2H1L1 și 8D2(Re) concurează cu B7-2, testul ELISA

Concentrația de anticorp (μg/ml)	Antigenul de acoperire: CTLA4- mFc, 0,5 μg/ml									
	10D1		11.2.1		8D2H1L1		8D2		8D2(Re)	
3	0,569	0,550	0,492	0,442	0,450	0,384	0,407	0,336	0,367	0,375
1:3	0,500	0,466	0,387	0,402	0,404	0,332	0,359	0,306	0,331	0,289
1:9	0,736	0,782	0,412	0,482	0,467	0,371	0,456	0,355	0,384	0,315
1:27	0,982	1,137	0,676	0,585	0,671	0,633	0,675	0,675	0,464	0,443
1:81	1,196	1,355	1,120	0,965	1,038	1,007	1,091	1,050	0,713	0,622
1:243	1,171	1,380	1,237	1,214	1,215	1,069	1,154	1,172	0,862	0,766
1:729	1,307	1,388	1,362	1,229	1,231	1,253	1,242	1,264	0,826	0,725

0	1,030	1,171	1,187	1,100	1,130	1,076	1,034	1,183	0,915	0,861
Receptorul	B7/2-His, 1 µg/ml									
Anticorpul secundar	Anti-His murin conjugat cu HRP Anticorp secundar									

Tabelul 13

Anticorpul 8D2H2L2 și 8D2H3L3 concurează cu B7-1, testul ELISA

Concentrația de anticorp (µg/ml)	Proteina de acoperire: B7/1- hFc, 0,3 µg/ml							
	8D2 H2L2		8D2 H3L3		10D1		11.2.1	
5	0,207	0,232	0,187	0,202	0,166	0,172	0,080	0,089
1:3	0,346	0,267	0,286	0,327	0,210	0,194	0,090	0,097
1:9	0,625	0,702	0,416	0,388	0,486	0,548	0,160	0,138
1:27	0,577	0,727	0,590	0,503	0,673	0,621	0,488	0,369
1:81	0,830	0,743	0,747	0,617	0,663	0,647	0,698	0,660
1:243	0,707	0,760	0,673	0,768	0,652	0,775	0,755	0,900
1:729	0,780	0,882	0,840	0,842	0,705	0,691	0,909	0,793
0	0,577	0,752	0,632	0,745	0,732	0,909	0,683	0,735
Antigenul	CTLA4-mFc 0,3 µg/ml							
Anticorpul secundar	IgG capră anti-murin conjugat cu HRP Anticorp secundar							

5

Tabelul 14

Anticorpul 8D2H2L2 și 8D2H3L3 concurează cu B7-2 pentru legarea la CTLA4, testul ELISA

Concentrația de anticorp (µg/ml)	Antigenul de acoperire: CTLA4- mFc, 0,5 µg/ml							
	8D2 H2L2		8D2 H3L3		10D1		11.2.1	
1.5	0,377	0,376	0,417	0,432	0,449	0,408	0,372	0,494
1:3	0,616	0,537	0,540	0,511	0,553	0,602	0,437	0,348
1:9	0,988	0,927	0,548	0,614	0,806	0,788	0,479	0,412
1:27	1,085	1,038	0,717	0,728	0,969	0,890	0,622	0,529
1:81	1,227	1,059	1,010	0,951	0,974	0,916	0,805	0,649
1:243	1,136	1,066	1,255	1,160	0,935	0,921	0,930	0,754
1:729	1,218	1,158	1,239	1,162	1,108	1,045	0,981	0,746
0	1,094	1,068	1,198	1,214	1,082	1,047	0,987	0,819
Ligandul	B7/2-His, 1 µg/ml							
Anticorpul secundar	Anti-His murin conjugat cu HRP Anticorp secundar							

Tabelul 15

Anticorpul 8D2H2L15 și 8D2H2L17 concurează cu B7-1 pentru legarea la CTLA4, testul ELISA

Reproducție anticorp	Antigenul de acoperire: B7/1- hFc, 0,5 µg/ml											
	8D2 H2L2 (20150327)		8D2 H2L15		8D2 H2L17		10D1		11.2.1		8D2 H2L2 (20140422)	
5 µg/ml	0,09	0,10	0,07	0,07	0,06	0,07	0,08	0,11	0,06	0,06	0,12	0,14
1:3	0,13	0,14	0,07	0,07	0,06	0,07	0,33	0,24	0,09	0,08	0,26	0,24
1:9	0,29	0,26	0,07	0,09	0,08	0,08	0,71	0,78	0,33	0,30	0,45	0,49
1:27	0,66	0,58	0,70	1,03	0,89	0,93	1,11	1,17	1,14	1,19	1,06	1,10
1:81	0,69	0,62	0,68	1,18	0,97	0,79	1,16	1,35	1,17	1,20	1,09	1,09
1:243	0,66	0,64	0,75	1,13	1,05	0,99	1,27	1,48	1,30	1,31	1,19	0,99
1:729	0,69	0,64	0,74	1,07	1,25	1,35	1,33	1,56	1,32	1,31	1,16	1,12
0	0,59	0,66	0,53	1,09	1,18	1,18	1,33	1,29	1,28	1,30	1,11	1,04
Ligandul	CTLA4-mFc, 0,3 µg/ml											
Anticorpul secundar	Anti-His murin conjugat cu HRP Anticorp secundar											

10

Tabelul 16

Anticorpul 8D2H2L15 și 8D2H2L17 concurează cu B7-2 pentru legarea la CTLA4, testul ELISA

Reproducția anticorpului	CTLA4-mFc, 2 µg/ml											
	8D2H2L2 20140422		8D2H2L15		8D2H2L17		10D1		11.2.1		8D2H2L2 20150327	
1 µg/ml	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	0,05
1:3	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,07	0,07	0,05	0,05	0,47	0,37
1:9	0,15	0,16	0,17	0,19	0,06	0,12	0,44	0,35	0,17	0,16	0,65	0,58
1:27	0,55	0,59	0,42	0,48	0,50	0,57	0,73	0,70	0,57	0,57	0,79	0,70
1:81	0,76	0,84	0,75	0,75	0,77	0,81	0,85	0,86	0,84	0,76	0,86	0,77
1:243	0,84	0,79	0,83	0,84	0,82	0,87	0,86	0,89	0,84	0,85	0,83	0,84
1:729	0,77	0,76	0,94	1,00	0,97	0,98	0,99	0,91	0,87	0,85	0,82	0,80
0	0,77	0,78	0,92	0,97	0,81	0,82	0,76	0,96	0,91	0,80	0,80	0,76
Ligandul	B7/2-His, 0,5 µg/ml											
Anticorpul secundar	Anti-His murin conjugat cu HRP Anticorp secundar (1:4000)											

Tabelul 17

- 5 Eficacitatea de legare EC₅₀ a anticorpilor 8D2, 8D2(Re) și 8D2 anticorpilor umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 la antigenul CTLA4 în concurență cu B7, obținută cu ajutorul curbei de simulare în procesul de analiză, folosind testul competitiv ELISA

	Anticorpul EC ₅₀ (nM)		10D1 EC ₅₀ (nM)		11.2.1 EC ₅₀ (nM)	
	B7-1	B7-2	B7-1	B7-2	B7-1	B7-2
8D2	0,44	0,208	-	0,464	-	0,15
8D2(Re)	0,514	0,153	-	0,464	-	0,15
8D2H1L1	2,478	0,178	1,91	0,464	1,691	0,15
8D2H2L2	5,932	1,643	5,15	2,056	1,073	0,172
8D2H2L2	2,973	0,368	-	-	-	-
8D2H2L2	3,118	0,301	-	-	-	-
8D2H3L3	2,144	0,167	5,15	2,056	1,073	0,172
8D2H2L15	1,973	0,227	4,586	0,629	2,606	0,349
8D2H2L17	1,787	0,296	4,586	0,629	2,606	0,349

Notă: 8D2H2L2 a fost măsurat în trei repetitivități.

- 10 Rezultatele prezentate mai sus arată că anticorpul 8D2, 8D2(Re) și 8D2 anticorpul umanizat 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 cu toții pot concura cu B7 pentru legarea la antigenul CTLA4. În particular, anticorpul 8D2, 8D2(Re), 8D2H1L1 și 8D2H2L2 concurează cu B7-2 mai puternic decât 10D1 pentru legarea la CTLA4, în timp ce 8D2H2L17 concurează mai puternic decât anticorpul 10D1 și 11.2.1 atât cu B7-1, cât și cu B7-2 pentru legarea la CTLA4.

- 15 Exemplul 9. Analiza activității biologice a anticorpului monoclonal 8D2 și a anticorpilor umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 în celule

- 20 Pentru a determina influența anticorpului monoclonal 8D2 și a anticorpilor umanizați 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15, 8D2H2L17 și a anticorpilor de control 10D1 și 11.2.1 asupra exprimării IL-2 de către celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC), sângele periferic a fost colectat de la donatori sănătoși în tuburi pentru colectare conținând heparină de sodiu. PBMC a fost preparat sub formă de suspensie de celule după diluare în PBS și centrifugare în mediul de separare (la 2550 rot/min, timp de 20 minute). În suspensia de celule a fost adăugat SEB (1 µg/ml)/PHA (30 µg/ml), fiind apoi plasată într-un incubator la o temperatură de 37°C și o atmosferă saturată de umiditate, conținând 5% CO₂, pentru cultivare ulterioară. S-au adăugat, de asemenea, limfocitele Raji și anticorpul.
- 25 După co-incubare timp de 48 de ore, PBMC a fost spălat de două ori cu PBS și adăugat în plăci cu 96 de godeuri, câte 10.000 de celule per godeu. Apoi au fost adăugați anticorpul cu un gradient adecvat de concentrație. După incubare timp de 20 minute, celulele Raji tratate cu PBS timp de 1 oră au fost adăugate în număr de 10.000 celule per godeu pentru co-cultivare timp de 72 ore. După co-cultivarea

timp de 72 h, cultura de celule a fost colectată pentru a obține supernatantul și profilul expresiei IL-2 din supernatantul co-culturii de celule a fost determinat folosind kitul de reactivi pentru testul ELISA conform instrucțiunilor atașate la acest kit (Dakewe Co., DKW12-1020-096).

După efectuarea analizei statistice, rezultatele experimentelor au fost prezentate în Figurile 32 și 33. În comparație cu grupul de limfocite T și grupul de celule Raji în cazul anticorpului monoclonal 8D2, toți anticorpii umanizați ai acestuia 8D2H1L1, 8D2H2L2, 8D2H3L3, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 pot bloca în mod efectiv legarea CTLA4 la B7 și îmbunătăți expresia IL-2 de către limfocitele T (Figurile 32 și 33). În particular, autorii invenției de față au descoperit în mod surprinzător faptul că anticorpii 8D2H2L2, 8D2H2L15 și 8D2H2L17 depășesc semnificativ anticorpii de control 10D1 și 11.2.1. La o concentrație de 10 nM, aceștia asigură un nivel de IL-2 comparabil sau chiar mai mare decât nivelul pe care îl asigură 10D1 sau 11.2.1 la o concentrație de 100 nM. Astfel, anticorpii din prezenta invenție au capacitatea de a spori nivelul de IL-2 la concentrații mai scăzute, de exemplu, de circa 10 nM.

Exemplul 10. Activitatea anti-tumorală a anticorpului monoclonal 8D2H2L2 *in vivo*

Activitatea antitumorală a anticorpului monoclonal 8D2H2L2 *in vivo* a fost evaluată utilizând modelul animal hu-SCID-Raji. Celulele mononucleare din sângele periferic (PBMC) uman a fost izolat cu ajutorul reactivului Ficoll și activat folosind SEB într-o concentrație de 1 μg/ml, timp de 3 zile. Apoi, un număr de $1,25 \times 10^6$ PBMC activate au fost amestecate cu un număr de 5×10^6 celule Raji din limfomul Burkitt și cu 8D2H2L2 (20 mg/kg), fiind injectat subcutanat în șoldul șoarecilor SCID cu absență congenitală a celulelor natural-killer (NK). În paralel, a fost format un grup de control izotipic cu 5 animale în grup. În continuare, acestor animale le-a fost administrată o doză de 20 mg/kg prin injecție intravenoasă o dată pe săptămână, timp de trei săptămâni consecutive. Volumul tumorii a fost măsurat de două ori pe săptămână până la sfârșitul experimentului sau până în momentul când volumul tumorii a atins 1000 mm³.

După cum se demonstrează în Figura 34, anticorpul 8D2H2L2 poate suprima în mod semnificativ creșterea tumorii în modelul hu-SCID-Raji. Acest rezultat indică asupra faptului că anticorpul în cauză poate fi utilizat în condiții clinice pentru tratamentul limfomului.

Deși exemplele specifice de realizare a prezentei invenții au fost descrise în detaliu, în lumina informației dezvăluite în descriere specialiștii din domeniul dat al tehnicii vor putea aprecia că pot fi făcute diferite schimbări și modificări în cazul unor anumite detalii. Volumul complet al invenției de față este determinat de către revendicările anexate.

Lista secvențelor

<110> AKESO BIOPHARMA, INC.
 <120> ANTICORP MONOCLONAL ANTI-CTLA4 SAU FRAGMENT DE LEGARE A ANTIGENULUI ACESTUIA, COMPOZITIE FARMACEUTICA ȘI UTILIZARE A ACESTEIA
 <130> IEC150044PCT
 <150> 201410377352.9
 <151> 2014-08-01
 <160> 34
 <170> Patentin version 3.2
 <210> 1
 <211> 375
 <212> ADN
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> Secventa nucleotida, care codifica proteina CTLA4ECD
 <400> 1
 gcaatgcacg tggcccagcc tgetgtggtg ctggccagca gccgaggcat cgccagcttt 60
 gtgtgtgagt atgcctctcc aggcacagcc actgaggctcc gggtgacagt gcttcggcag 120
 gctgacagcc aggtgactga agtctgtgctg gcaacctaca tgatggggaa tgagtggacc 180
 ttctagatg attcatctg caggggcacc tccagtggaa atcaagtga cctcactatc 240
 caaggactga ggcccatgga caggggactc tacatctgca aggtggagct catgtaccca 300
 ccgccatact acctgggcat aggcacagga acccagattt atgtaattga tccagaaccg 360
 tgcccagatt ctgac 375
 <210> 2
 <211> 125
 <212> Proteina

<213> Secventa artificiala

<220>

<223> secventa aminoacida a proteinei CTLA4ECD

<400> 2

Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly
 1 5 10 15
 Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu
 20 25 30
 Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val
 35 40 45
 Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp
 50 55 60
 Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu
 85 90 95
 Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln
 100 105 110
 Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 115 120 125

<210> 3

<211> 364

<212> Proteina

<213> Secventa artificiala

<220>

<223> secventa aminoacida a proteinei hibride CTLA4ECD-mFc

<400> 3

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

245 250 255
 Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu
 260 265 270
 Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp
 275 280 285
 Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr
 290 295 300
 Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 305 310 315 320
 Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu
 325 330 335
 Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His
 340 345 350
 His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 355 360

<210> 4
 <211> 1092
 <212> ADN
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa nucleotida, care codifica proteina hibrida CTLA4ECD-mFc
 <400> 4
 gcaatgcattg tcgcacagcc tgcagtggtc ctggcaagct ccagggaat cgctagcttc 60
 gtgtgcgaat acgttcccc aggcaaggca accgaggtcc gggtgacagt cctgagacag 120
 gccgacagcc aggtgacaga agtctgcgcc gctacttata tgatgggcaa cgagctgacc 180
 ttcttgacg atagcatttg taccgggaca tctagtggaa accaagtga tctgaccatc 240
 cagggcctgc gcgctatga cacagggtg tacatttga aagtggagct gatgtatccc 300
 cctccatact atctgggaat cggcaacggg acccagatct acgtgattga tctgaacca 360
 tgccccgact ccgatgagaa tctgtatttc caggggaccac gagggccccc aattaagcca 420
 tgtcccccctt gcaaatgtcc tgcaccaaac ctgctgggag gaccaagcgt gtccatctt 480
 ccacccaaga tcaaggacgt gctgatgac tctactgagc ccattgtgac ctgcgtggtc 540
 gtggacgtga gcgaggacga tctgatgtg cagatcagtt gggtcgtaa caatgtgaa 600
 gtccacacag ctcagactca gaccatagg gaggattaca atagtactct gcgcgtcgtg 660
 tcagcactgc ccattcagca ccaggactgg atgagcggca aggagttcaa gtgcaaagt 720
 aacaacaagg atctgcccgc acctatcgag agaactattt ccaagcctaa agggctctgtg 780
 agggcccccac aggtgtatgt cctgcctcca cccgaggaag agatgactaa gaaacaggtg 840
 aactgggaaga ccgaactgaa ctataaaaat acagagcctg tcttgagctc agatggaagc 960
 tactttatgt atagcaagct gcgagtggaa aagaaaaact gggtcgagcg gaacagctac 1020
 tctttagtg tggtccacga agggctgcat aatcaccaca ccactaaatc atttcccga 1080
 actccaggca aa 1092

<210> 5
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa nucleotida, care codifica domeniul variabil al lantului
 greu al anticorpului monoclonal 8D2
 <400> 5
 gaggtgaac tggacgaac tggcgggggg ctggtgcagc ccggacgacc tatgaagctg 60
 tcatgcgtcg ccagcggtt cacttttagc gacaactgga tgaattgggt gaggcagagc 120
 ccagagaagg ggctggaatg gctggtcag atcccaaca aacctacaa ttatgagacc 180
 tactattctg acagtgtgaa gggccgggtc acaattcca gagacgattc taaaagctcc 240
 gtctacctcg agatgaaca tctgagagcg gaagatatgg ggatctacta ttgcacagca 300
 cagtcgctt attggggaca gggcactctg gtcacagtct ccgcc 345

<210> 6
 <211> 115
 <212> Proteina
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa aminoacida a domeniului variabil al lantului greu
 al anticorpului monoclonal 8D2
 <400> 6
 Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Pro Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Met Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ala
 115

<210> 7
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa nucleotida, care codifica domeniul variabil al lantului
 usor al anticorpului monoclonal 8D2
 <400> 7
 gacattcaga tgacacagag tectgettec ctgagtgcct cagtggggga gaccgtcaca 60
 atcacttgcg gcacctctga aaacatctac ggcggggtga attggtatca gcggaagcag 120
 ggcaaaagtc ccagctgct gatcttcgga gcaacaaacc tggccgacgg catgagctcc 180
 cggtttagcg ggtccggatc tggcagacag tacagcctga agattctag tctgcacca 240
 gacgatgtgg ctacttacta ttgccagaat gtctgagga gtcccttcac ctttggtca 300
 ggaacaaagc tggagatc 318

<210> 8
 <211> 106
 <212> Proteina
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa aminoacida a domeniului variabil al lantului usor
 al anticorpului monoclonal 8D2
 <400> 8
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Gly Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Phe Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe

85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105

<210> 9
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa nucleotida, care codifica domeniul variabil al
 lantului greu al anticorpului monoclonal 8D2H1L1
 <400> 9
 gaagtgcagc tggctgagtc cggggggggc ctggtgcagc caggaggatc aatgcgactg 60
 agctgcgccg ctccggctt caccttcagc gacaactgga tgaattgggt caggcaggca 120
 ccaggaaagg gactggagtg gctggcacag atccgcaaca aacctacaa ctacgaaact 180
 tactacagcg actccgtgaa ggggcggttc accatttcta gagacgattc taaaacagt 240
 gtgtacctgc agatgaatag cctgaagacc gaggatacag gagtctacta ttgtaccgca 300
 cagtttgctt attgggggca gggcactctg gtagacagtct ctcca 345

<210> 10
 <211> 115
 <212> Proteina
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa aminoacida a domeniului variabil al lantului usor al
 anticorpului monoclonal 8D2H1L1
 <400> 10
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 11
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa nucleotida, care codifica domeniul variabil al lantului
 usor al anticorpului monoclonal 8D2H1L1
 <400> 11
 gacattcaga tgactcagag cccctcaagc ctgtccgcat ctgtgggcca ccgagtcacc 60
 atcacatgca gaacctcca gaacatctac ggcgggctga attggtatca gcgaaagcag 120
 gggaaaagtc ccaagctgct gatctacggg gcaacaaacc tggccagcgg aatgagctcc 180
 agattcagtg gatcaggcag cgggacagat tatactctga aaatttctag tctgcacca 240
 gacgatgtgg caacctacta ttgccagaat gtctgaggt cacccttcac ctttgaagc 300
 ggcacaaaac tggagatcaa g 321

<210> 12
 <211> 107
 <212> Proteina
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa aminoacida a domeniului variabil al lantului usor al anticorpului monoclonal 8D2H1L1
 <400> 12
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 13
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa nucleotida, care codifica domeniul variabil al lantului greu al anticorpului monoclonal 8D2H2L2, 8D2H2L15 sau 8D2H2L17
 <400> 13
 gaagtgcagc tggctgagtc cggggggggc ctggtgcagc caggaggatc aatgcgactg 60
 agctgcgccg ctctcgctt cacttcagc gacaactgga tgaattgggt caggcaggca 120
 ccaggaaagg gactggagtg gctggcacag atccgcaaca aaccttaca ctacgaaact 180
 tactacagcg cctccgtgaa ggggcgggtc accatttcta gagacgattc taaaacagt 240
 gtgtacctgc agatgaatag cctgaagacc gaggatacag gagtctacta ttgtaccgca 300
 cagtttgcct attgggggca gggcactctg gtgacagtct ctcca 345

<210> 14
 <211> 115
 <212> Proteina
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa aminoacida a domeniului variabil al lantului greu al anticorpului monoclonal 8D2H2L2, 8D2H2L15 sau 8D2H2L17
 <400> 14
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Met Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 321
<212> ADN
<213> Secventa artificiala
<220>
<223> secventa nucleotida, care codifica domeniul variabil al
lantului usor al anticorpului monoclonal 8D2H2L2
<400> 15
gacattcaga tgactcagag ccctcaagc ctgagtgcct cagtgggaga cgggtcacc 60
atcacatgca gaaccagcga gaacatctac ggcggcctga actggtatca gcgaaagcca 120
ggcaagagcc ccaagctgct gatctacggg gcaaccaacc tggcctctgg agtgagctcc 180
agattcagcg gcagcggctc tgggaccgac tatactctga ccatttctag tctgcagcct 240
gaagatgtgg caacatacta ttgccagaat gtctgaggt cccattcac ctttgatct 300
ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 16
<211> 107
<212> Proteina
<213> Secventa artificiala
<220>
<223> secventa aminoacida a domeniului variabil al lantului usor al
anticorpului monoclonal 8D2H2L2
<400> 16
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 17
<211> 345
<212> ADN
<213> Secventa artificiala
<220>
<223> secventa nucleotida, care codifica domeniul variabil al
lantului greu al anticorpului monoclonal 8D2H3L3
<400> 17
gaggtgcagc tggctgagtc tggaggcggc ctggtgcagc ccggcgggtc actgcgactg 60
agctgcgccg ctccggctt caccctcagc gacaactgga tgaattgggt gaggcaggca 120
cccgggaagg ggctggagtg ggctgctcag atccgcaaca aaccttcaa ttatgagaca 180
gaatacgcag cctctgtgaa ggggcgggtc actattagta gagacgatag caagaacagc 240
gcctatctcg agatgaatag cctgaagacc gaagatacag ccgtctacta ttgtacagct 300
cagtttgcac actggggcca gggaactctg gtgacctgca gctcc 345

<210> 18
<211> 115

<212> Proteina
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa aminoacida a domeniului variabil al lantului greu al anticorpului monoclonal 8D2H3L3
 <400> 18
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Ala Gln Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 19
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa nucleotida, care codifica domeniul variabil al lantului usor al anticorpului monoclonal 8D2H3L3
 <400> 19
 gacattcaga tgactcagag cccttctct ctgtccgcat ctgtgggaga ccgggtcacc 60
 atcacatgca gaccagcga gaacatctac ggcggcctga actggtatca gcagaagcca 120
 ggcaaagctc ccaagetgct gatctacgga gcaacctccc tggcatctgg agtgccatcc 180
 cggttcagtg gatcaggcag cgggaccgac tatactctga ccattagctc cctgcagcct 240
 gaagacttcg ccacatacta ttgccagaac gtgctgaggt cccattcac ctttgatct 300
 ggcaccaagc tggagatcaa g 321

<210> 20
 <211> 107
 <212> Proteina
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa aminoacida a domeniului variabil al lantului usor al anticorpului monoclonal 8D2H3L3
 <400> 20
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Thr Ser Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 21
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa nucleotida, care codifica domeniul variabil al lantului
 usor al anticorpului monoclonal 8D2H2L15
 <400> 21
 gacatccaga tgactcagtc tccagctcc ctgtccgctt ctgtgggcca tgggtcact 60
 atcacctgta gaaccagcga gaacatttac ggcggactga attggtatca gaggaagccc 120
 gggaaaagtc ctaagctgct gatctacgga gcaacaaacc tggcctccgg cgtgtctagt 180
 cgcttcagtg gatcaggcag cgggaccgac tataactga ctattcaag cctgcagcca 240
 gaggatgtgg ccacatacta ttgccagaat gtcctgagcc ggcaccccggt atttggtca 300
 gggaccaaac tggaaattaa g 321

<210> 22
 <211> 107
 <212> Proteina
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa aminoacida a domeniului variabil al lantului usor al
 anticorpului monoclonal 8D2H2L15
 <400> 22
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Arg His Pro
 85 90 95
 Gly Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 23
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa nucleotida, care codifica domeniul variabil al
 lantului usor al anticorpului monoclonal 8D2H2L17
 <400> 23
 gacatccaga tgactcagtc accagctcc ctgagtgtt cagtgggcca tgggtcact 60
 atcacctgta gaaccagcga gaacatttac ggcggactga attggtatca gaggaagccc 120
 gggaaaagcc ctaagctgct gatctacgga gcaacaaacc tggcctccgg cgtgtctagt 180
 cgcttcagcg gcagcggctc tgggaaccgac tataactga ctattcaag cctgcagcca 240
 gaggatgtgg ccacatacta ttgccagaat gtcctgtcct ctcgaccgg atttggtcagt 300
 gggaccaaac tggaaattaa g 321

<210> 24
 <211> 107
 <212> Proteina
 <213> Secventa artificiala

<220>

<223> secventa aminoacida a domeniului variabil al lantului usor al anticorpului monoclonal 8D2H2L17

<400> 24

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

<210> 25

<211> 636

<212> ADN

<213> Secventa artificiala

<220>

<223> secventa nucleotida, care codifica proteina CTLA4

<400> 25

atgggcgtcc tgctgactca gagaacctg ctgtccctgg tgctggcact gctgttctct 60
 tcaatggctt caatggctat gcattgtggt cagccagcag tggctctggc aagctccagg 120
 gggatcgcca gtttcgtgtg cgagtacgcc tcacctggaa aggctacaga agtccgggtg 180
 actgtctcga gacaggtga ctctcaggtg accgaggtct gcgccgtac atatatgatg 240
 ggcaacgaac tgacctttct ggacgattcc attgtactg gcacctctag tgggaaccaa 300
 gtgaatctga ctatccaggg actgcgagca atggacaccg gactgtacat ttgcaaagtg 360
 gagctgatgt atccccctcc atactatctg ggcacgggga atggaacaca gatctacgtg 420
 attgateccg aacctgtgcc agacagcgat ttctgtctgt ggattctggc agccgtgtca 480
 agcggcctgt tcttttatag cttttctgtg actgccgtct cctgtcttaa gatgtgaag 540
 aaacgatccc cctgaccac aggggtggtc gtgaaaatgc cacctaccga gcccgagtgc 600
 gaaaaacagt tccagccata ctttaccct atcaat 636

<210> 26

<211> 212

<212> Proteina

<213> Secventa artificiala

<220>

<223> secventa aminoacida a proteinei CTLA4

<400> 26

Met Gly Val Leu Leu Thr Gln Arg Thr Leu Leu Ser Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Phe Pro Ser Met Ala Ser Met Ala Met His Val Ala Gln Pro
 20 25 30
 Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu
 35 40 45
 Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg
 50 55 60
 Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met
 65 70 75 80
 Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser
 85 90 95
 Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp
 100 105 110

Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 115 120 125
 Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu
 130 135 140
 Pro Cys Pro Asp Ser Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser
 145 150 155 160
 Ser Gly Leu Phe Phe Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser
 165 170 175
 Lys Met Leu Lys Lys Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Val Val Lys
 180 185 190
 Met Pro Pro Thr Glu Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe
 195 200 205
 Ile Pro Ile Asn
 210

<210> 27
 <211> 8
 <212> Proteina
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa aminoacida CDR
 <400> 27
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Asn Trp
 1 5

<210> 28
 <211> 10
 <212> Proteina
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa aminoacida CDR
 <400> 28
 Ile Arg Asn Lys Pro Tyr Asn Tyr Glu Thr
 1 5 10

<210> 29
 <211> 6
 <212> Proteina
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa aminoacida CDR
 <400> 29
 Thr Ala Gln Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 30
 <211> 6
 <212> Proteina
 <213> Secventa artificiala
 <220>
 <223> secventa aminoacida CDR
 <400> 30

Glu Asn Ile Tyr Gly Gly
 1 5

<210> 31
 <211> 3
 <212> Proteina

<213> Secventa artificiala

<220>

<223> secventa aminoacida CDR

<400> 31

Gly Ala Thr

1

<210> 32

<211> 9

<212> Proteina

<213> Secventa artificiala

<220>

<223> secventa aminoacida CDR

<400> 32

Gln Asn Val Leu Arg Ser Pro Phe Thr

1

5

<210> 33

<211> 9

<212> Proteina

<213> Secventa artificiala

<220>

<223> secventa aminoacida CDR

<400> 33

Gln Asn Val Leu Ser Arg His Pro Gly

1

5

<210> 34

<211> 9

<212> Proteina

<213> Secventa artificiala

<220>

<223> secventa aminoacida CDR

<400> 34

Gln Asn Val Leu Ser Ser Arg Pro Gly

1

5

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Grosso JF., Jure-Kunkel MN. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. Cancer Immun., 2013; v. 13:5, Online, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3559193/>
2. US 6984720 B1 2006.01.10
3. US 6682736 B1 2004.10.27

(57) Revendicări:

1. Anticorp sau fragment al acestuia de legare la antigen, care se leagă cu CTLA4 uman, selectat din grupa constând din:

a) anticorp sau fragment al acestuia de legare la antigen, care cuprinde regiunea variabilă a lanțului greu SECV. ID NO: 14 și regiunea variabilă a lanțului ușor SECV. ID NO: 16; și

b) anticorp sau fragment al acestuia de legare la antigen care cuprinde regiunea variabilă a lanțului greu SECV. ID NO: 14 și regiunea variabilă a lanțului ușor SECV. ID NO: 16, în care în secvența SECV. ID NO: 14 metionina din poziția 18 poate fi substituită cu un aminoacid selectat din grupa constând din: leucină, valină, izoleucină și alanină.

2. Anticorp sau un fragment al acestuia de legare la antigen, conform revendicării 1, în care metionina din poziția 18 în SECV. ID Nr. 14 este substituită cu leucină și regiunea variabilă a lanțului ușor SECV. ID Nr. 16.

3. Anticorp sau un fragment al acestuia de legare la antigen, conform revendicării 1 sau 2, care reprezintă un anticorp umanizat sau un fragment al acestuia de legare la antigen.

4. Anticorp sau un fragment al acestuia de legare la antigen, conform oricăreia dintre revendicările 1-3, care se leagă la CTLA4 uman cu un K_D mai mic de aproximativ 10^{-5} M, după cum a fost determinat prin rezonanță plasmatică de suprafață.

5. Anticorp sau un fragment al acestuia de legare la antigen, conform oricăreia dintre revendicările 1-4, în care anticorpul sau fragmentul acestuia de legare la antigen:

- (a) blochează legarea CTLA4 uman cu B7 uman;
- (b) reglează activitatea CTLA4 uman;
- (c) înlătură imunosupresia organismului de către CTLA4 uman;
- (d) activează limfocitele T; și/sau
- (e) sporește nivelul de expresie al IL-2 în limfocitele T.

6. Una sau mai multe molecule de acizi nucleici izolate, care codifică anticorpul sau fragmentul acestuia de legare la antigen, conform revendicării 1.

7. Una sau mai multe molecule de acizi nucleici izolate, conform revendicării 6, în care una sau mai multe molecule de acizi nucleici izolate conține secvența nucleotidă, reprezentată de secvența SECV. ID NO: 13 sau SECV. ID NO: 15.

8. Vector, care conține o moleculă de acid nucleic izolată, conform revendicării 6.

9. Celulă gazdă care conține vectorul, conform revendicării 8.

10. Procedeu de obținere a unui anticorp sau a unui fragment al acestuia de legare la antigen, conform oricăreia dintre revendicările 1-5, care cuprinde etapele de cultivare a celulei gazdă, conform revendicării 9, în condiții adecvate și de izolare a anticorpului sau a fragmentului acestuia de legare la antigen din cultura celulară.

11. Compoziție farmaceutică cu conținut de un anticorp sau un fragment al acestuia de legare la antigen, conform oricăreia dintre revendicările 1-5, și un purtător farmaceutic acceptabil și/sau un adjuvant.

12. Anticorp sau un fragment al acestuia de legare la antigen, conform oricăreia dintre revendicările 1-5, pentru utilizare într-un procedeu de tratare a unui subiect, care este o ființă umană, suferindă de tumoare, cum ar fi melanom, tumoare renală/cancer renal, cancer de prostată, cancer de vezică urinară, cancer colorectal, cancer al tractului gastro-intestinal și/sau tumoare hepatică/cancer hepatic.

13. Anticorp sau un fragment al acestuia de legare la antigen, conform oricăreia dintre revendicările 1-5, pentru utilizare în procedeul de tratare a limfomului.

14. Procedeu *in vitro*, care cuprinde etapa de introducere în celule a unei cantități eficiente dintr-un anticorp sau dintr-un fragment al acestuia de legare la antigen, conform oricăreia dintre revendicările 1-5, în care acest procedeu este selectat dintre următoarele procedee:

- (a) procedeu de detectare a nivelului de CTLA4 uman într-o probă,
- (b) procedeu de blocare a legării CTLA4 uman cu B7 uman,
- (c) procedeu de reglare a activității CTLA4 uman sau a nivelului de CTLA4 uman,
- (d) procedeu de înlăturare a imunosupresiei organismului de către CTLA4 uman,
- (e) procedeu de activare a limfocitelor T, sau
- (f) procedeu de creștere a nivelului de exprimare a IL-2 în limfocitele T.

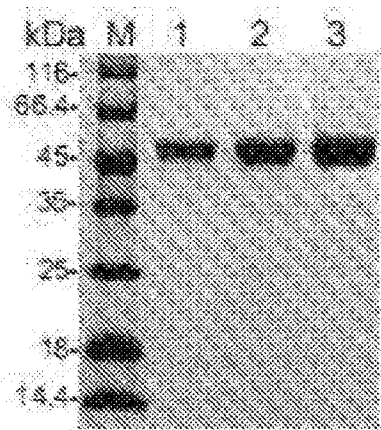


Fig. 1

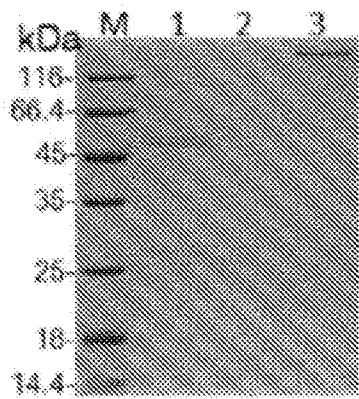


Fig. 2

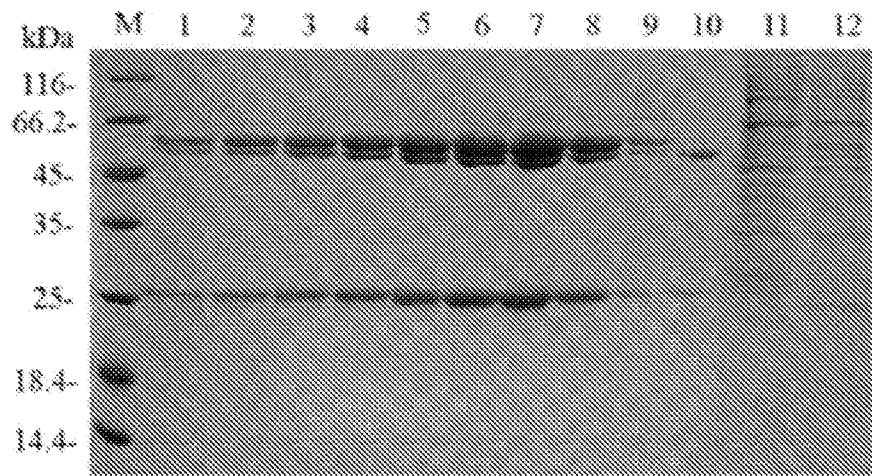


Fig. 3

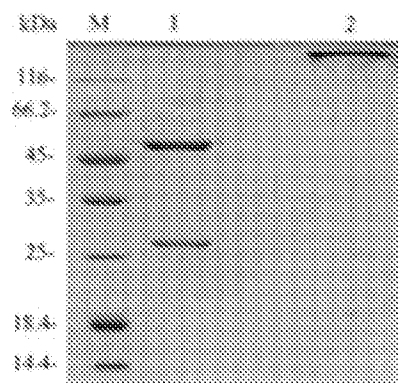


Fig. 4

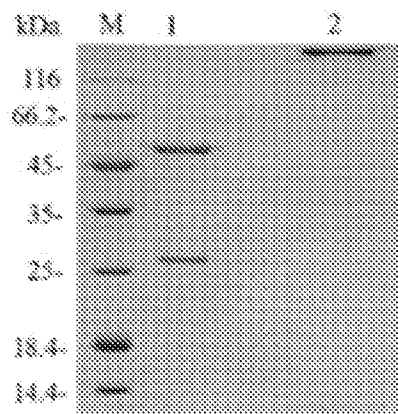


Fig. 5

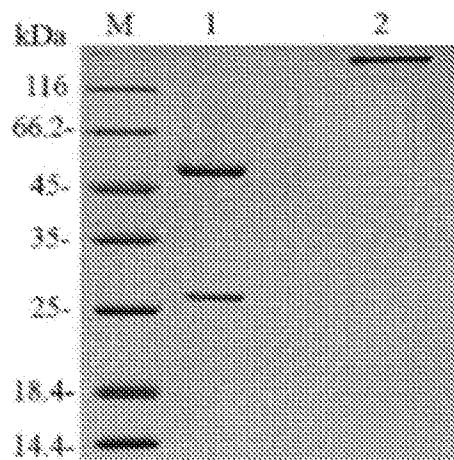


Fig. 6

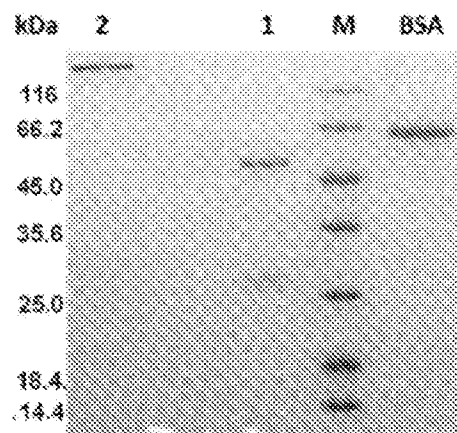


Fig. 7

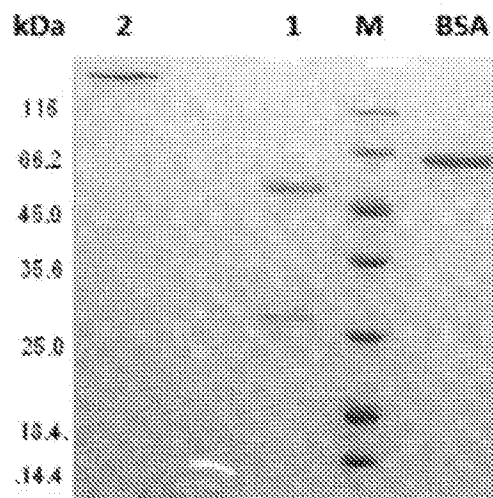


Fig. 8

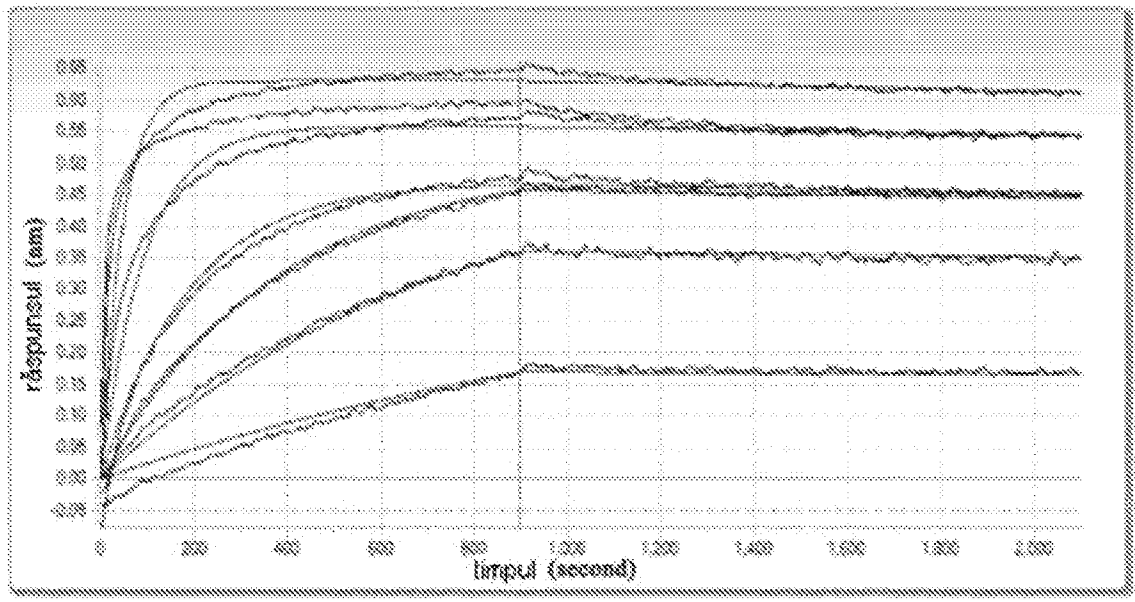


Fig. 9

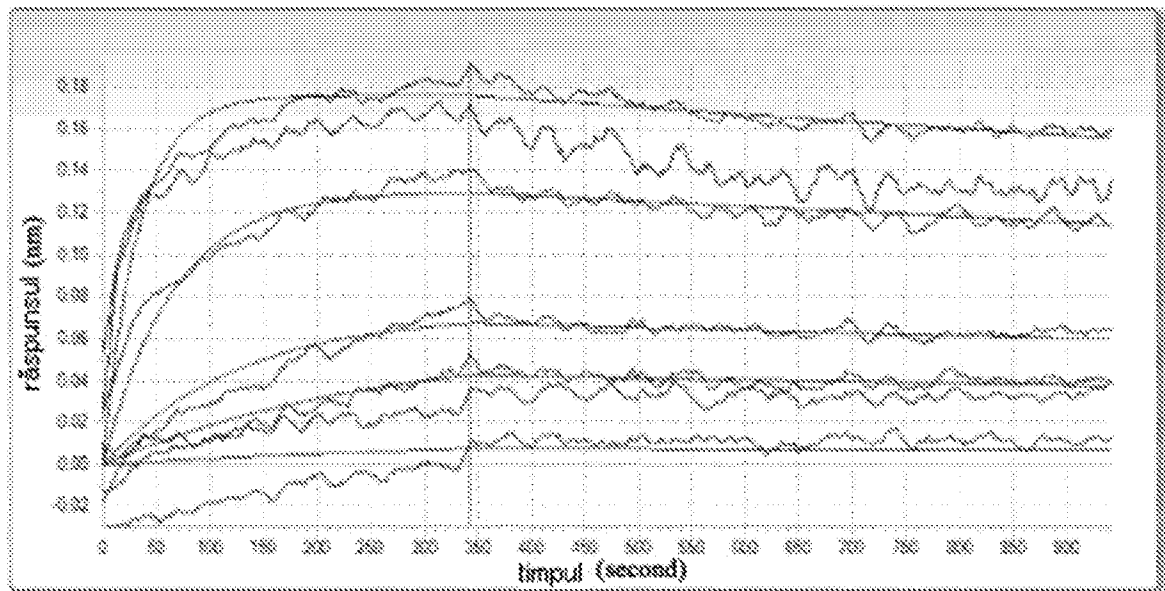


Fig. 10

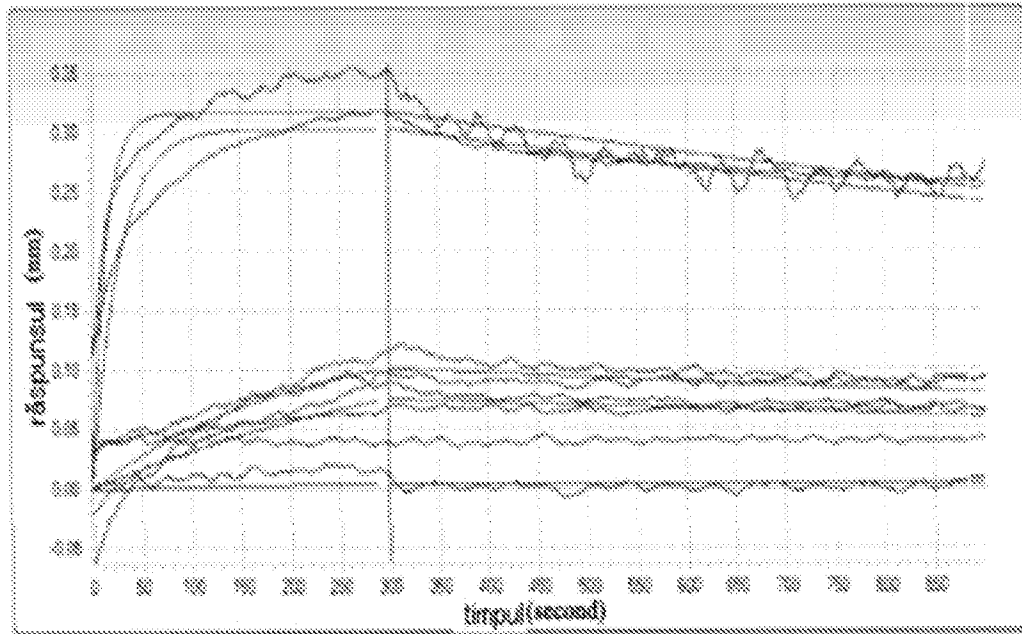


Fig. 11

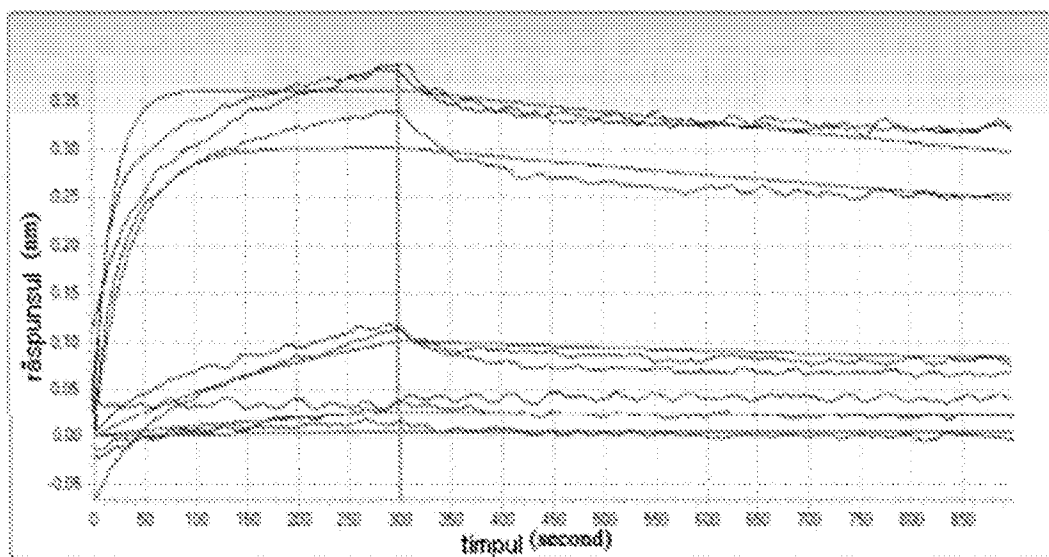


Fig. 12

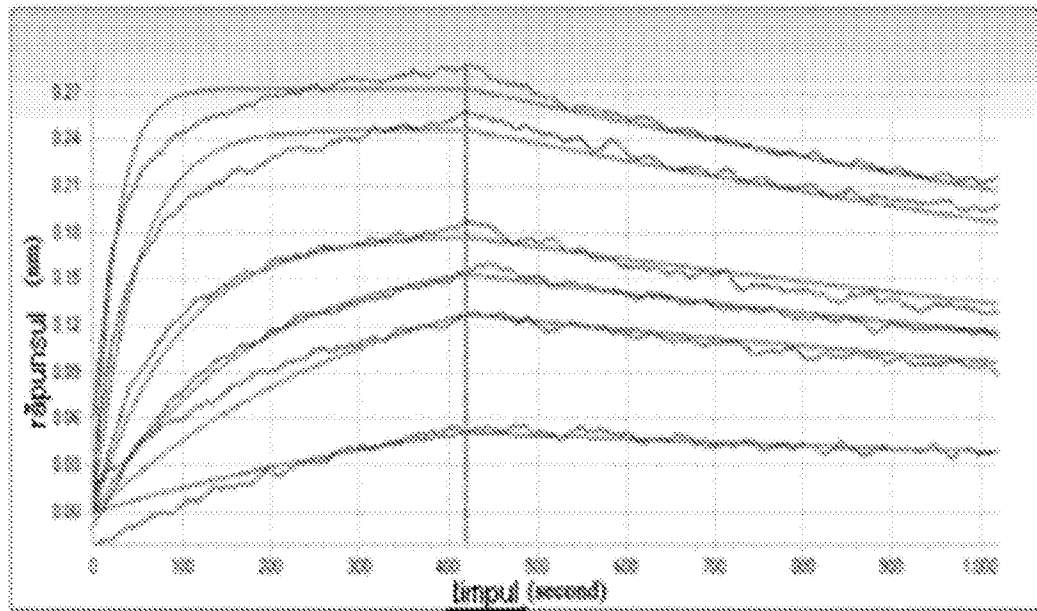


Fig. 13

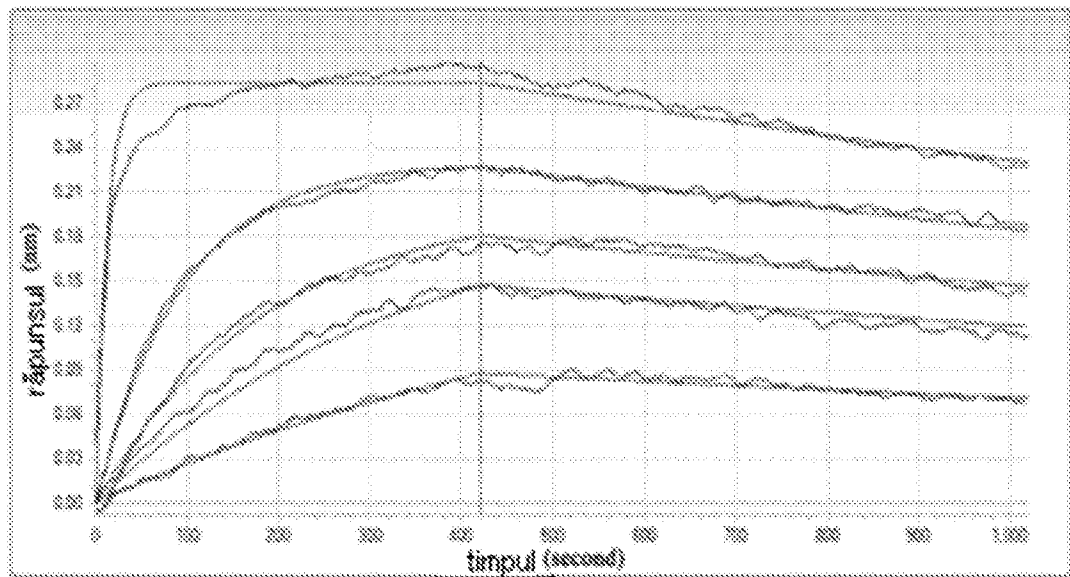


Fig. 14

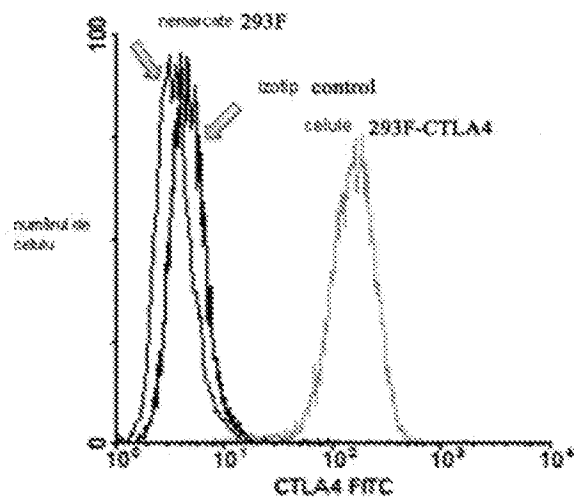


Fig. 15

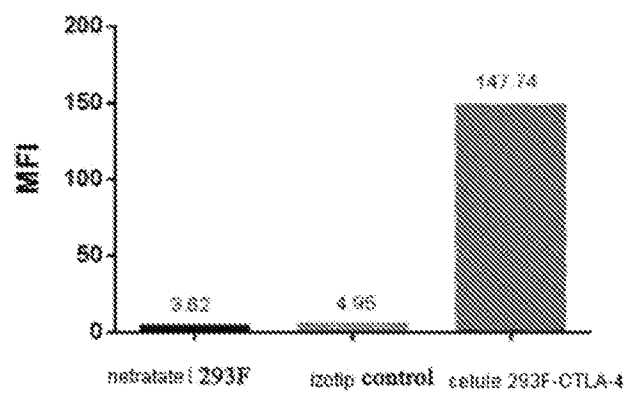


Fig. 16

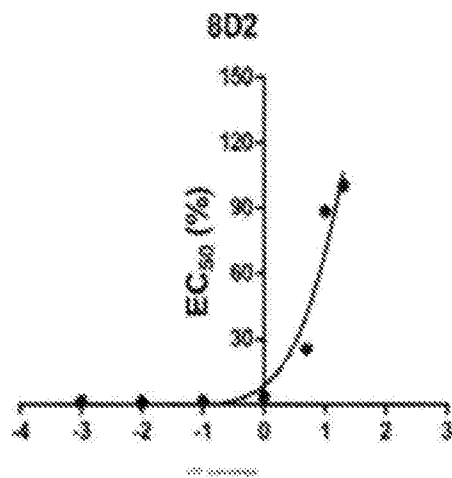


Fig. 17

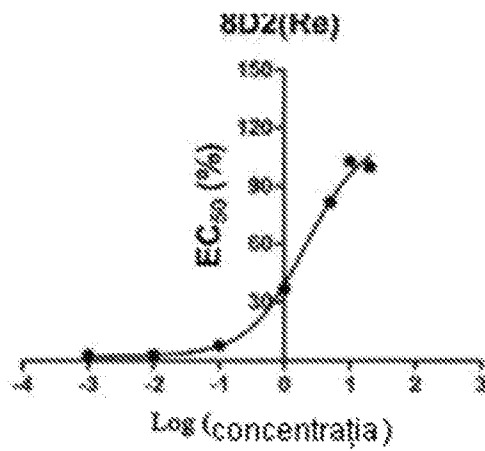


Fig. 18

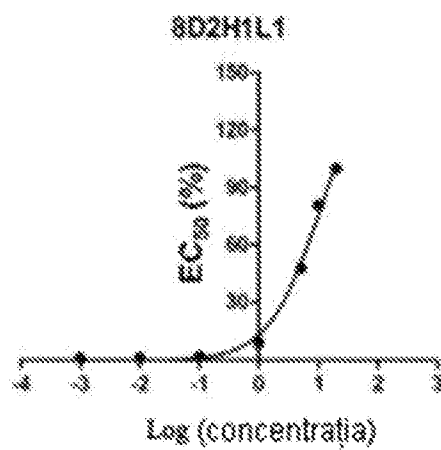


Fig. 19

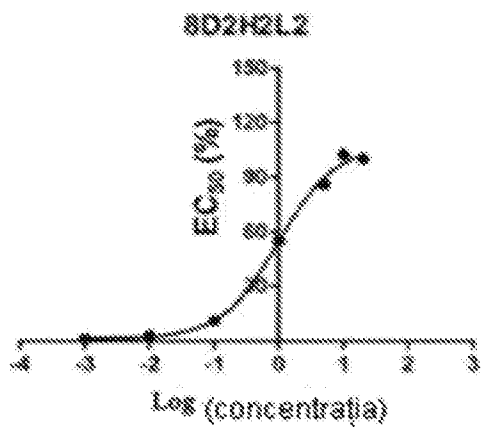


Fig. 20

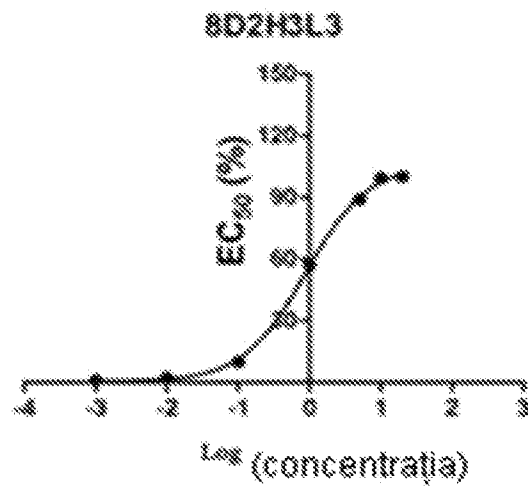


Fig. 21

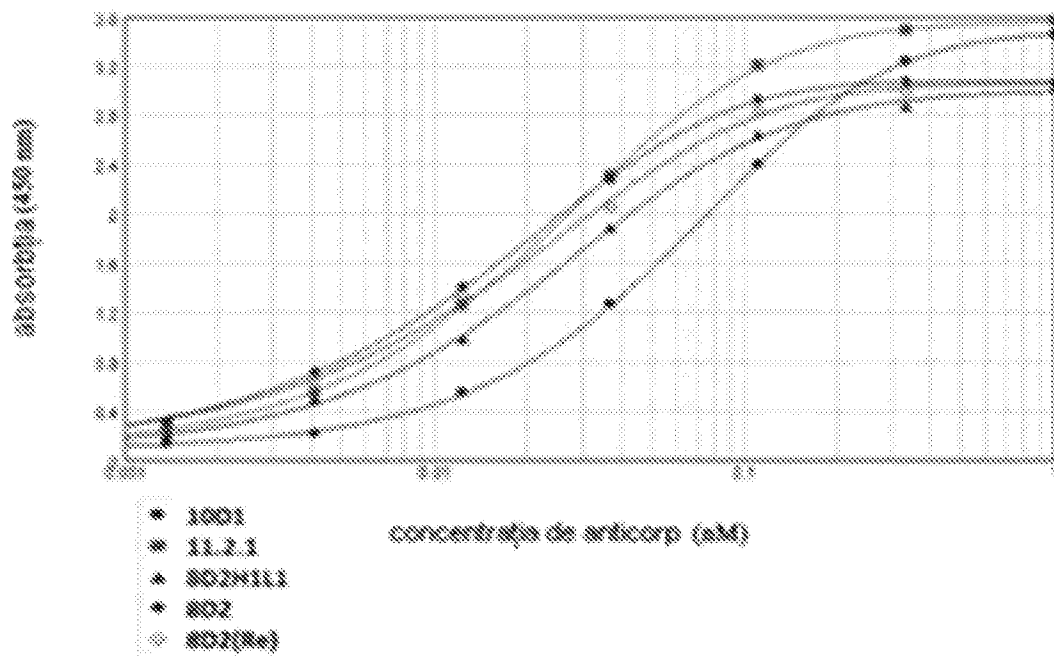


Fig. 22

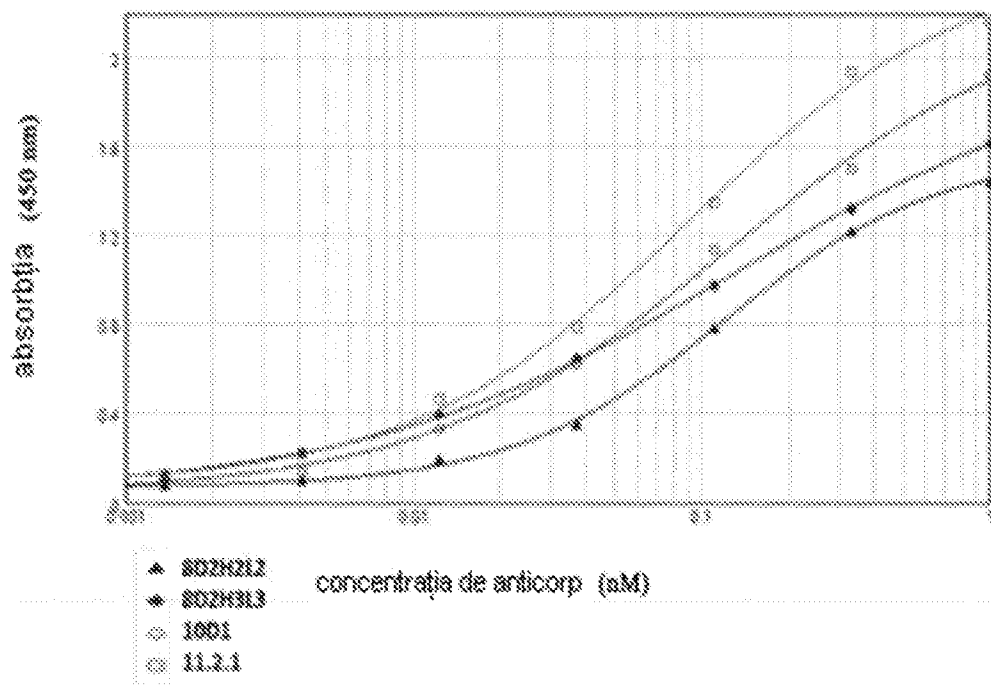


Fig. 23

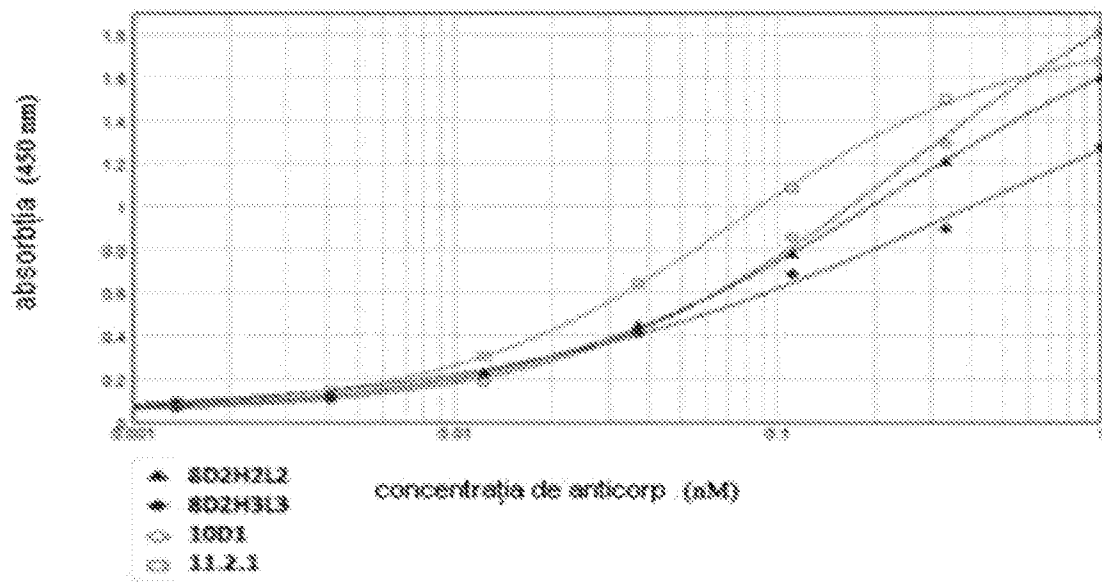


Fig. 24

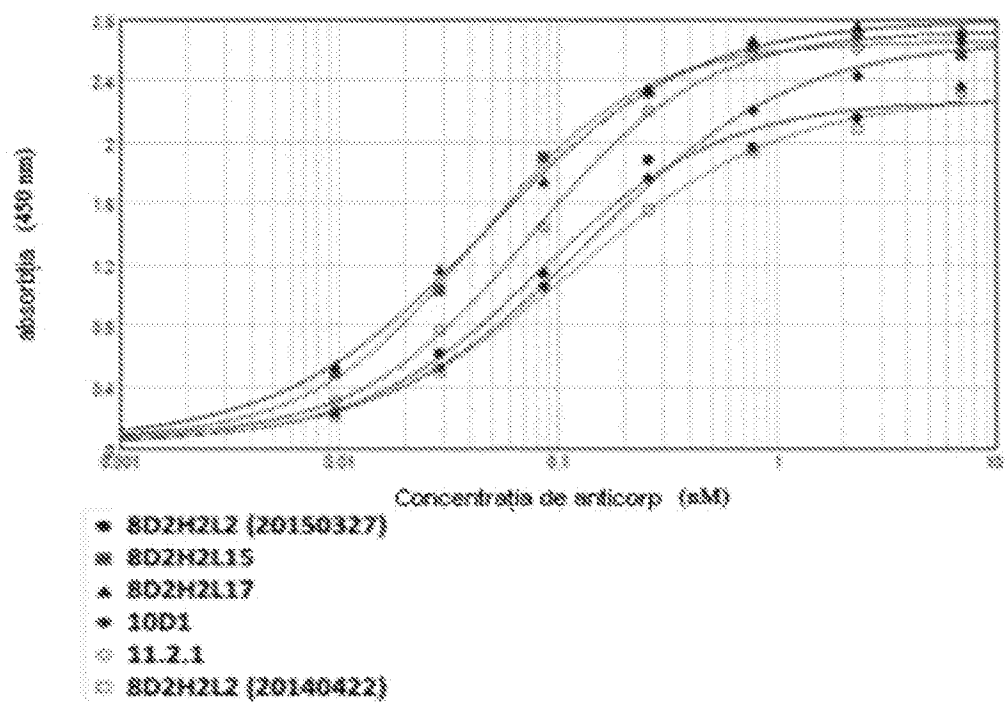


Fig. 25

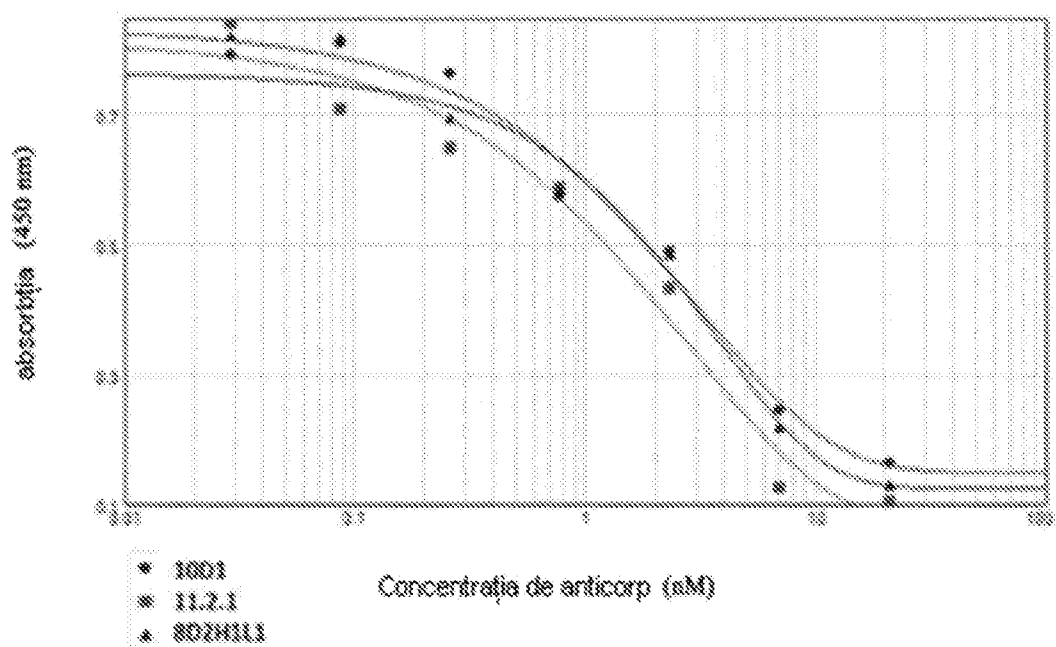


Fig. 26

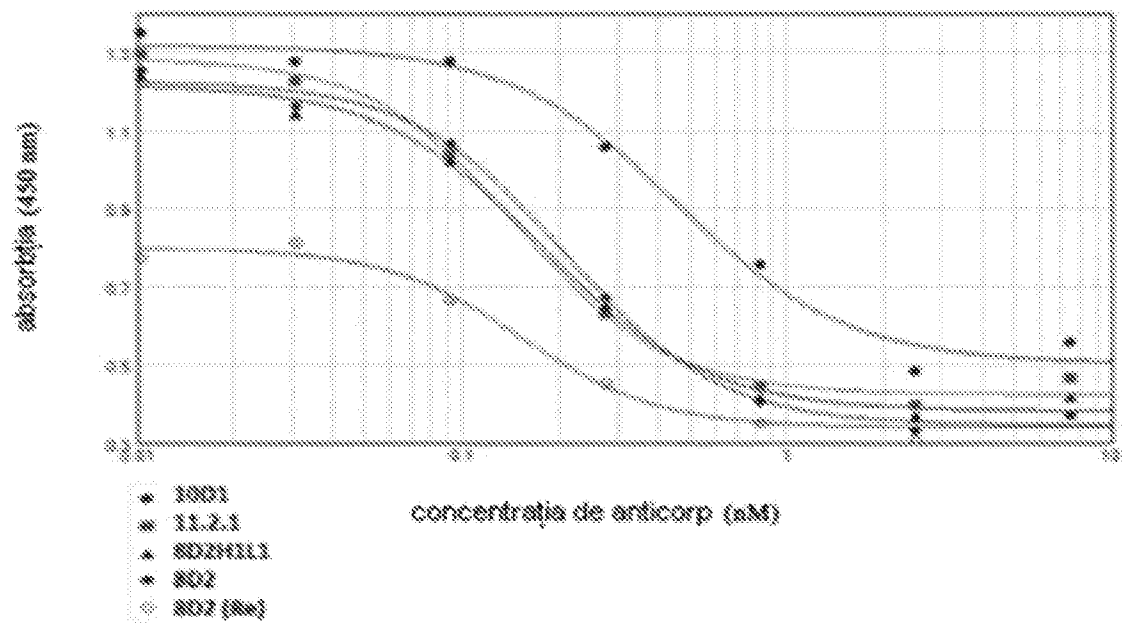


Fig. 27

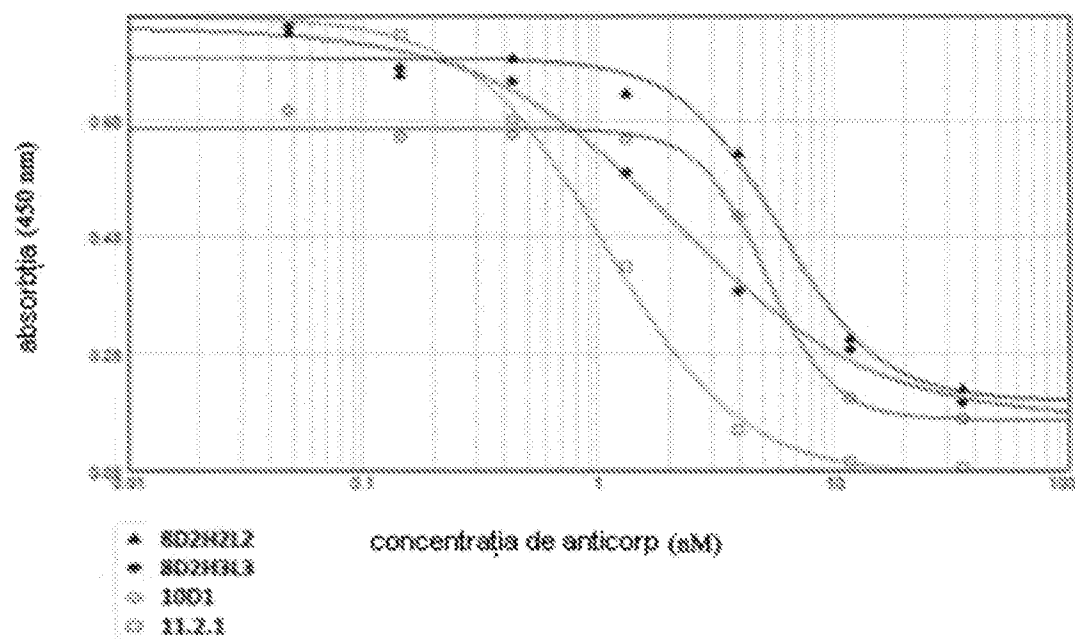


Fig. 28

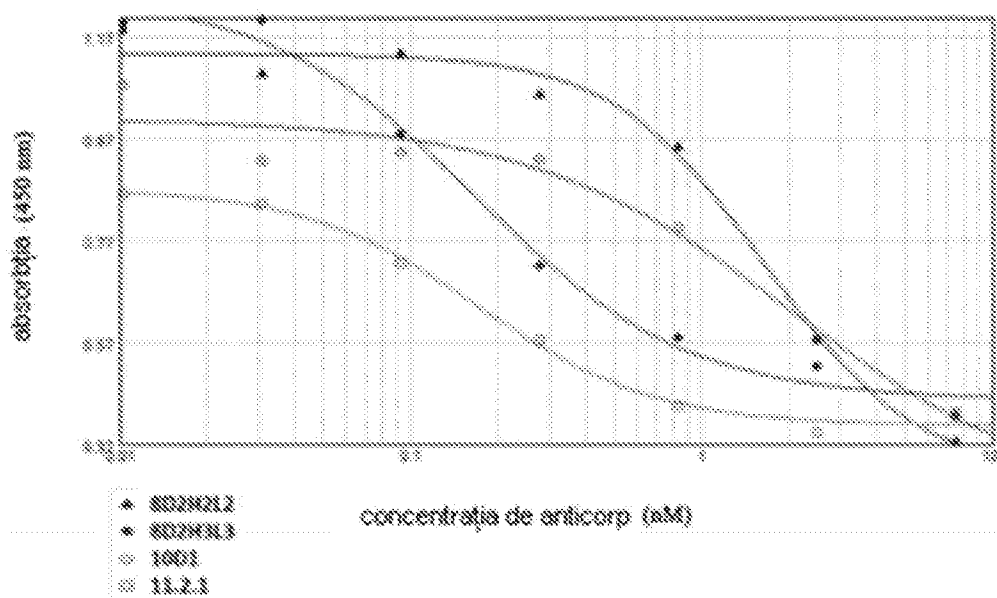


Fig. 29

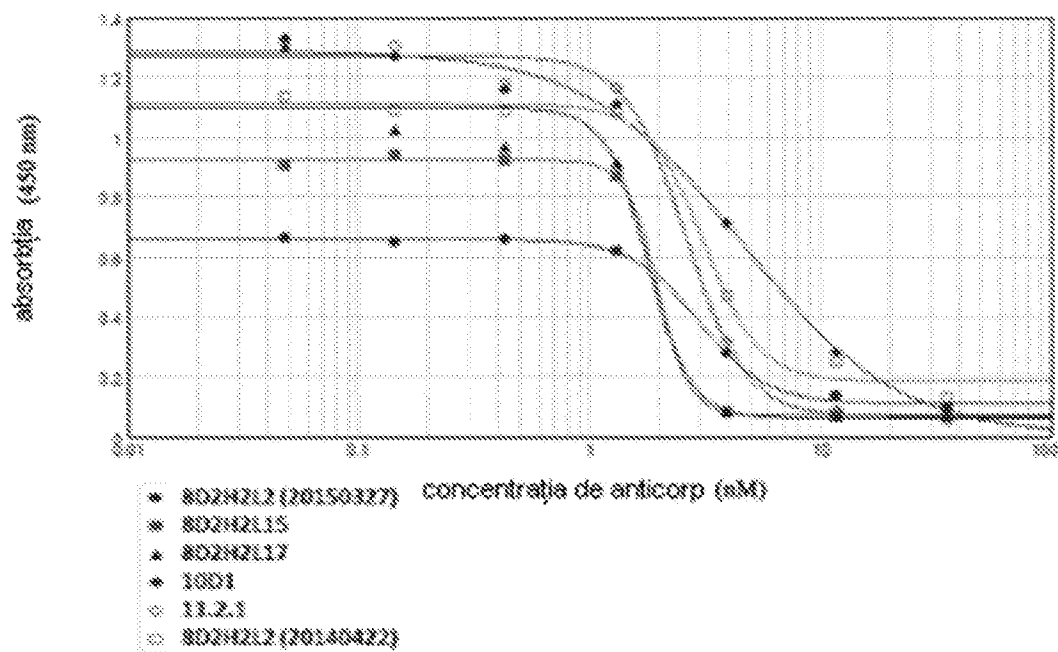


Fig. 30

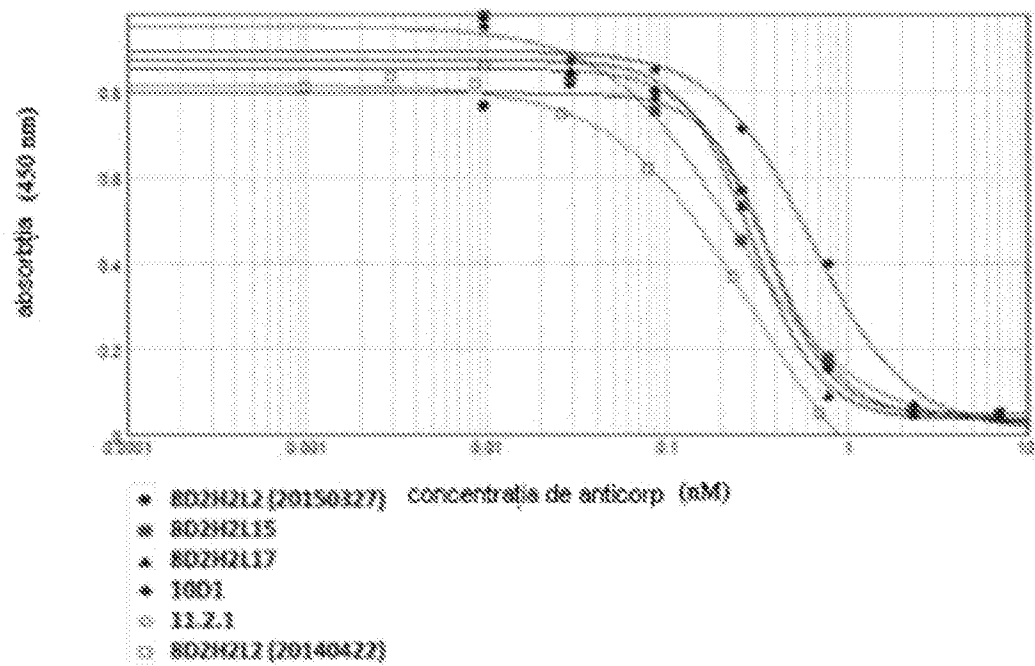


Fig. 31

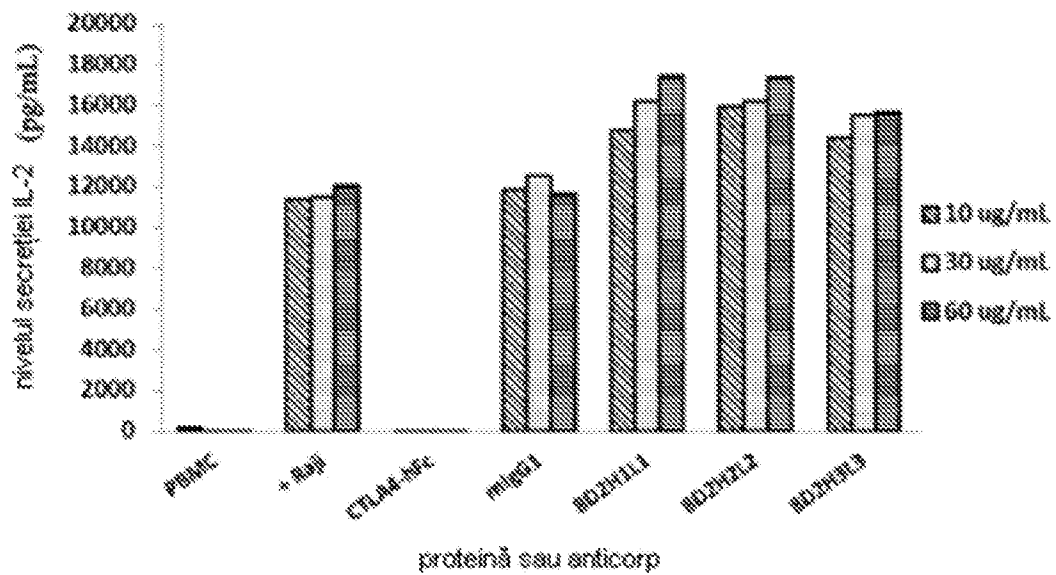


Fig. 32

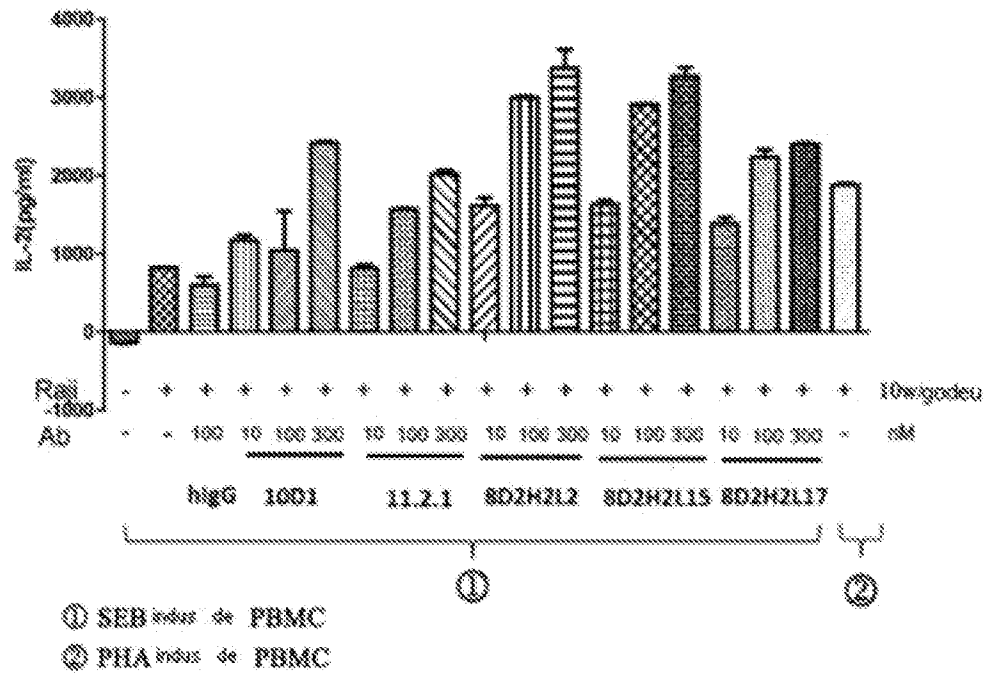


Fig. 33

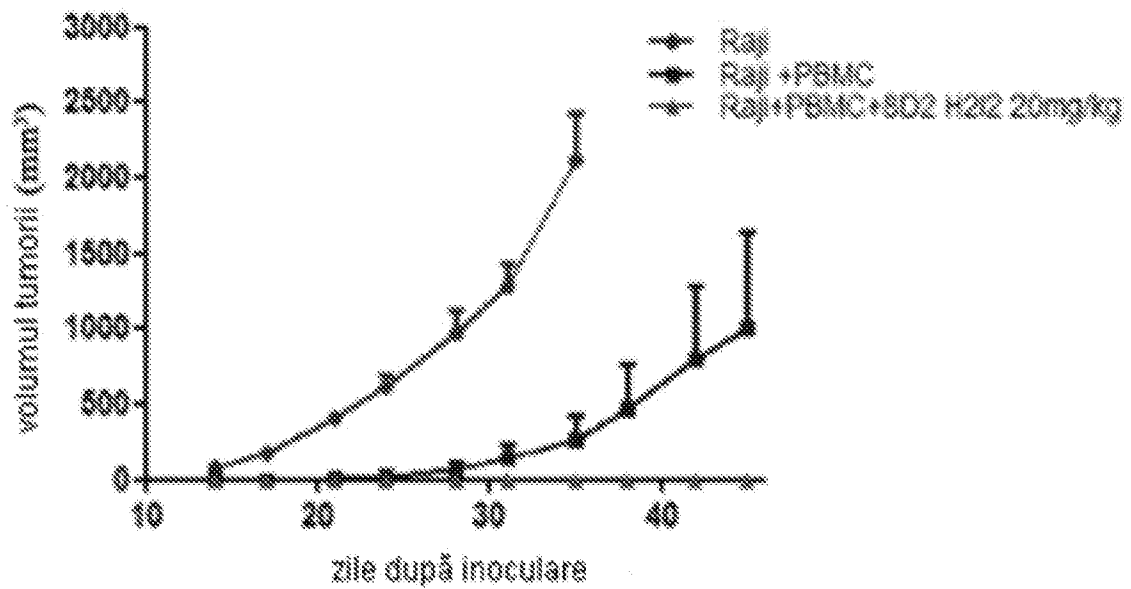


Fig. 34

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2017 0022 (32) Data de prioritate recunoscută: 2014.08.01
 (22) Data depozit: 2015.07.31 Raport de documentare internațională: X da
 (85) Data deschiderii fazei naționale: 2017.02.27
 (86) Cerere internațională: PCT/CN2015/085721, 2015.07.31
 (87) Publicarea cererii internaționale: WO 2016/015675 A1, 2016.02.04
 (71) Solicitant: **AKESO BIOPHARMA INC., CN**
 (54) **Titlu: Anticorp monoclonal anti-CTLA4 sau fragment de legare a acestuia la antigen, compoziție farmaceutică și utilizarea lor**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *C07K 16/28* (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stânga/dreapta):
 C07K 16/28; C12N 15/13; A61K 39/395; A61P 35/00; A61P 37/04; G01N 33/577; C12N 1/21;
 C12N 5/10; C12N 15/63; C07K 19/00
 anti-CTLA4, anticorp monoclonal, 8D2H2L2

"Worldwide" (Espacenet):

C07K16/28; C12N15/13; A61K39/395; A61P35/00; A61P37/04; G01N33/577; C12N1/21;
 C12N5/10; C12N15/63; C07K19/00
 anti-CTLA4, monoclonal antibody, 8D2H2L2

EA, CIS (Eapatis):

C07K16/28; C12N15/13; A61K39/395; A61P35/00; A61P37/04; G01N33/577; C12N1/21;
 C12N5/10; C12N15/63; C07K19/00
 анти-CTLA4, антитело, 8D2H2L2

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

www.google.com
 www.ardi.wipo.int
 books.google.com
 Google Scholar

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
Y	Fransen M. ș.a. Controlled local delivery of CTLA+4 blocking antibody induces CD8(+) T-cell-dependent tumor eradication and decreases risk of toxic side effects. Clinical Cancer Research, 2013, v. 19, nr. 19, p. 5381-5389	1-21
Y	WO 2012/120125 A1 2012.09.13	1-21
Y	Mellman I. ș.a. Cancer immunotherapy comes of age.	1-21

	Nature, 2011, v. 480, nr. 7378, p. 480-489	
A	Maki R.G. ș.a. A pilot study of anti-CTLA4 antibody ipilimumab in patients with synovial sarcoma. Sarcoma, 2013, art. nr. 168145	1-21
Y	Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. N. Engl. J. Med., 2010, v. 363, nr. 8., p. 711-723	1-21
A, D	Grosso JF., Jure-Kunkel MN. CTLA-4 blockade in tumor models: an overview of preclinical and translational research. Cancer Immun., 2013; v. 13:5, Online, URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3559193/	1-21
A, D	US 6984720 B1 2006.01.10	1-21
A, D, C	US 6682736 B1 2004.10.27	1-21
A	RU 2494107 c2 2013.09.27	1-21
A	RU 2356579 C1 2009.05.27	1-21
A	US 20050196402 A1 2005.09.08	1-21
A	WO 2007113648 A2 2007.10.11	1-21
A	WO 2006101692 A1 2006.09.28	1-21

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri

Data finalizării documentării, 03.06.2021

Examinator, GUȘAN Ala