



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019011651-6 A2



(22) Data do Depósito: 07/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 07/01/2020

(54) Título: ANTICORPOS ANTI-CTLA-4 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS

(51) Int. Cl.: C07K 16/28; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 07/12/2016 US 62/431,272.

(71) Depositante(es): AGENUS INC.; LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH LTD; MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER.

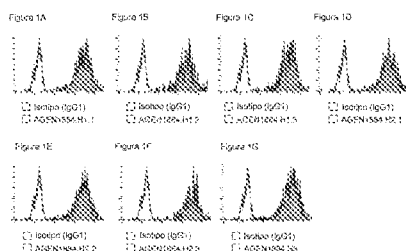
(72) Inventor(es): MARC VAN DIJK; CORNELIA ANNE MUNDT; GERD RITTER; DAVID SCHAEER; JEDD DAVID WOLCHOK; TAHA MERGHOUB; NICHOLAS STUART WILSON; DAVID ADAM SAVITSKY; MARK ARTHUR FINDEIS; DENNIS JOHN UNDERWOOD; JEAN-MARIE CUIILLEROT; IGOR PROSCURSHIM; OLGA SHEBANOVA.

(86) Pedido PCT: PCT US2017065011 de 07/12/2017

(87) Publicação PCT: WO 2018/106862 de 14/06/2018

(85) Data da Fase Nacional: 04/06/2019

(57) Resumo: A presente revelação fornece anticorpos que especificamente se ligam a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e antagonizam função de CTLA-4. Também são fornecidas composições farmacêuticas que compreendem esses anticorpos, ácidos nucleicos que codificam esses anticorpos, vetores de expressão e células hospedeiras para produzir esses anticorpos, e métodos de tratamento de um indivíduo com o uso desses anticorpos.



“ANTICORPOS ANTI-CTLA-4 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS”

1. APLICAÇÕES RELACIONADAS

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido Provisório nº US 62/431.272, depositado em 7 de dezembro de 2016, que está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

2. CAMPO

[0002] A presente revelação refere-se a anticorpos que se ligam especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e a métodos de uso do mesmo.

3. ANTECEDENTES

[0003] Os linfócitos T são centrais para a resposta imune adaptativa ao antígeno. Pelo menos dois sinais são necessários para a ativação completa de células T virgens (Bretscher 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96: 185 a 190). Um primeiro sinal específico para o antígeno é fornecido pela interação do receptor de células T (TCR) com o complexo MHC/peptídeo em uma célula apresentadora de antígeno (APC). Um segundo sinal coestimulador é fornecido pelas interações entre receptores na célula T e seus ligantes em uma célula apresentadora de antígeno (APC). O envolvimento tanto do TCR MHC quanto das interações coestimuladoras leva à ativação de células T através de várias vias intracelulares, incluindo cálcio-calciúrina e proteína quinase ativada por mitógeno RAS, e subsequente ativação de fatores de transcrição para vários compostos efetores, incluindo citocinas como IL-2. Esses eventos levam à proliferação de células T, à geração de um agrupamento de células T auxiliares CD4+(TH) e à expansão de células T citotóxicas CD8+ ativadas. Não só a coestimulação é crítica para a ativação completa das células T, como a sua ausência durante o envolvimento do TCR no MHC resulta em anergia e/ou apoptose.

[0004] Múltiplas vias coestimuladoras positivas e negativas estão envolvidas na regulação das células T; no entanto, as mais críticas estão entre CD28 em células T e B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) em

APCs. O CD28 promove a diferenciação de células T em células fenotípicas TH1 e aumenta a produção de anticorpos pelas células B e a ativação de células-T B7-1 e B7-2, expressos em APCs, como células dendríticas (DC) e células B, têm funções sobrepostas, mas distintas. B7-2 é constitutivamente expresso e é rapidamente regulado positivamente em APCs coincidentes com o acoplamento TCR/MHC (sinal 1). A expressão de B7-1 é muito baixa na célula em repouso, mas é tipicamente induzida após estimulação prolongada de células T. Essas diferenças sugerem que, embora a B7-2 possa ser importante na inicialização da ativação das células T, a B7-1 pode desempenhar um papel mais importante na perpetuação da resposta imune.

[0005] Após a ativação das células T, o receptor regulador negativo Antígeno-4 de Linfócito T Citotóxico (CTLA-4) é regulado positivamente nas células T (Alegre et al, 2001, Nat Rev Immunol 1:220-8). O CTLA-4 é estruturalmente homólogo ao CD28, mas liga-se mais fortemente aos ligantes B7-1 e B7-2. O CTLA-4 inibe a resposta imune de várias maneiras: compete com o CD28 pelos ligantes B7 e bloqueia assim a coestimulação; sinaliza negativamente para inibir a ativação de células T; e pode capturar CD80 e CD86 de células opostas por trans-endocitose, resultando em coestimulação deficiente via CD28 (Krummel e Allison, 1995, J Exp Med 182: 459 a 465; Walunas et al., 1994, Immunity 1: 405 a 413; Qureshi et al, 2011, Science 332: 600 a 603).

[0006] Dado o papel crítico da via coestimuladora B7 na promoção e manutenção de uma resposta imune, agentes terapêuticos projetados para antagonizar essa via são promissores para o tratamento de doenças e distúrbios autoimunes.

4. SUMÁRIO

[0007] A presente revelação fornece anticorpos que se ligam especificamente ao CTLA-4 humano e antagonizam a função do CTLA-4, por exemplo, imunossupressão mediada por CTLA-4. São também fornecidas composições farmacêuticas que compreendem tais anticorpos, ácidos

nucleicos que codificam tais anticorpos, vetores de expressão e células hospedeiras para produzir tais anticorpos e métodos de tratamento de um indivíduo com o uso de tais anticorpos. Os anticorpos descritos no presente documento são particularmente úteis para aumentar a ativação de células T em resposta a um antígeno (por exemplo, um antígeno tumoral ou um antígeno de doença infecciosa) e/ou diminuição da imunossupressão mediada por Treg e, por conseguinte, para tratar câncer em um indivíduo ou para tratar ou prevenir uma doença infecciosa em um indivíduo.

[0008] Assim, em um aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3 e uma região variável de cadeia leve que compreende regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que:

- (a) CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de SYSMN (SEQ ID NO: 10);
- (b) CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SSSSSSYIYYAXSVKG (SEQ ID NO: 18), em que X é E ou D;
- (c) CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de VGLXGPFDD1 (SEQ ID NO: 19), em que X é F ou M;
- (d) CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de RASQSVSRYLQ (SEQ ID NO: 15);
- (e) CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de GASTRAT (SEQ ID NO: 16); e
- (f) CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 17) e em que as sequências CDRH1, CDRH2 e CDRH3 do anticorpo não são SEQ ID NO: 10, 11 e 13, respectivamente.

[0009] Em certas modalidades, a CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11. Em certas modalidades, a CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 12. Em

certas modalidades, a CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 13. Em certas modalidades, a CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 14. Em certas modalidades, CDRH1, CDRH2 e CDRH3 compreendem as sequências de aminoácidos CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas nas SEQ ID NO: 10, 11 e 14; 10, 12 e 13; ou 10, 12 e 14, respectivamente. Em certas modalidades, CDRH1, CDRH2 e CDRH3 compreendem as sequências de aminoácidos CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas nas SEQ ID NO: 10, 12 e 14, respectivamente. Em certas modalidades, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NO: 10, 11, 14, 15, 16 e 17; 10, 12, 13, 15, 16 e 17; ou 10, 12, 14, 15, 16 e 17, respectivamente. Em certas modalidades, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NO: 10, 12, 14, 15, 16 e 17, respectivamente.

[0010] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 humano, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3 e uma região variável de cadeia leve que compreende regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2, e CDRL3, em que:

- (a) CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de SYSMN (SEQ ID NO: 10);
- (b) CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SSSSSSYIYYXSVKG (SEQ ID NO: 18), em que X é E ou D;
- (c) CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de VGLXGPF1 (SEQ ID NO: 19), em que X é F ou M;
- (d) CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de RASQSVSRYL (SEQ ID NO: 15);
- (e) CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de GASTRAT (SEQ ID NO: 16); e

(f) CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 17) e em que as sequências CDRH1, CDRH2 e CDRH3 do anticorpo não são SEQ ID NO: 10, 11 e 13, respectivamente.

[0011] Em certas modalidades, a CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11. Em certas modalidades, a CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 12. Em certas modalidades, a CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 13. Em certas modalidades, a CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 14. Em certas modalidades, CDRH1, CDRH2 e CDRH3 compreendem as sequências de aminoácidos CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas nas SEQ ID NO: 10, 11 e 14; 10, 12 e 13; ou 10, 12 e 14, respectivamente. Em certas modalidades, CDRH1, CDRH2 e CDRH3 compreendem as sequências de aminoácidos CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas nas SEQ ID NO: 10, 12 e 14, respectivamente. Em certas modalidades, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NO: 10, 11, 14, 15, 16 e 17; 10, 12, 13, 15, 16 e 17; ou 10, 12, 14, 15, 16 e 17, respectivamente. Em certas modalidades, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NO: 10, 12, 14, 15, 16 e 17, respectivamente.

[0012] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 humano, que compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3 e uma região variável da cadeia leve que compreende regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NO: 10, 12, 14, 15, 16 e 17, respectivamente.

[0013] Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 20. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 2 e 4-8. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 3. Em certas modalidades, a região variável da cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NO: 2 e 4-8. Em certas modalidades, a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8. Em certas modalidades, a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 3. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 23. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 24. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada que tem uma sequência de aminoácidos derivada de uma sequência da linha germinativa IGHV3-21 humana (por exemplo, IGHV3-21*01, por exemplo, que tem sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21).

[0014] Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100%

idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ. ID NO: 9. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve que tem uma sequência de aminoácidos derivada de uma sequência da linha germinativa IGKV3-20 humana (por exemplo, IGKV3-20*01, por exemplo, que tem sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22).

[0015] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 humano, que compreende uma região variável de cadeia pesada com uma sequência de aminoácidos derivada de uma sequência de linha germinativa IGHV3-21 humana (por exemplo, IGHV3-21*01, por exemplo, que tem sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21), em que a região variável da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 14. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia leve que tem uma sequência de aminoácidos derivada de uma sequência da linha germinativa IGKV3-20 humana (por exemplo, IGKV3-20*01, por exemplo, que tem sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22).

[0016] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 humano, que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO: 2-8. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NO: 23-26. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos

da SEQ ID NO: 23. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 24. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26.

[0017] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 humano, que compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada e a região variável de cadeia leve compreendem as sequências de aminoácidos estabelecido nas SEQ ID NO: 2 e 9; 3 e 9; 4 e 9; 5 e 9; 6 e 9; 7 e 9; ou 8 e 9, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8 e uma região variável da cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 23; e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 24; e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25; e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26; e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27.

[0018] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 humano, que compreende uma região variável de cadeia pesada que tem uma

sequência de aminoácidos derivada de uma sequência de linha germinativa IGHV3-21*01 humana (por exemplo, IGHV3-21*01 por exemplo, que tem sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21); e uma região variável da cadeia leve com uma sequência de aminoácidos derivada de uma sequência da linha germinativa IGKV3-20*01 humana (por exemplo, IGKV3-20*01, por exemplo, que tem uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22).

[0019] Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de cadeia pesada selecionada do grupo que consiste em IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2 humanas. Em certas modalidades, a região constante da cadeia pesada é IgG1. Em certas modalidades, a região constante da cadeia pesada é IgG2. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia leve selecionada do grupo que consiste em Igκ e Igλ humana.

[0020] Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada de IgG1. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 28. Em certas modalidades, a sequência de aminoácidos da região constante da cadeia pesada de IgG1 compreende mutações S239D/I332E, numeradas de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 29. Em certas modalidades, a sequência de aminoácidos da região constante da cadeia pesada de IgG1 compreende mutações S239D/A330L/I332E, numeradas de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 30. Em certas modalidades, a sequência de aminoácidos da região constante da cadeia pesada de IgG1 compreende mutações L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L, numeradas de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o

anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 31. Em certas modalidades, a região constante da cadeia pesada de IgG1 é IgG1 afucosilada.

[0021] Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada de IgG humana que uma variante de uma região constante da cadeia pesada de IgG humana do tipo selvagem, em que a região constante da cadeia pesada da IgG humana se liga a FcγRIIIA com uma afinidade mais elevada do que a humana. A região constante da cadeia pesada de IgG liga-se a FcγRIIIA. Em certas modalidades, a região constante da cadeia pesada da IgG humana variante é uma região constante da cadeia pesada da IgG1 humana variante.

[0022] Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia leve selecionada do grupo que consiste em Igk e Igλ humana. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia leve de Igk. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 32.

[0023] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que compete de forma cruzada pela ligação a CTLA-4 humano com um anticorpo descrito no presente documento. Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que atravessa a ligação a CTLA-4 humano com um anticorpo que compreende as sequências de aminoácidos da região variável da cadeia pesada e leve apresentadas nas SEQ ID NO: 8 e 9, respectivamente.

[0024] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga ao mesmo epítipo na CTLA-4 humano como um anticorpo descrito no presente documento. Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga ao mesmo epítipo na CTLA-4 humano como um anticorpo que compreende as

sequências de aminoácidos da região variável da cadeia pesada e leve apresentadas nas SEQ ID NO: 8 e 9, respectivamente.

[0025] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga, por exemplo, especificamente a um epítipo do CTLA-4 humano. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítipo localizado dentro de uma região de CTLA-4 humano consistindo em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NO: 34-39. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítipo localizado dentro de uma região da CTLA-4 humano que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 37. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítipo localizado dentro de uma região da CTLA-4 humano que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 36. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítipo localizado dentro de uma região de CTLA-4 humano que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 35. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítipo localizado dentro de uma região da CTLA-4 humano que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítipo localizado dentro de uma região de CTLA-4 humano que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 38. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítipo localizado dentro de uma região de CTLA-4 humano que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 39.

[0026] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo ou anticorpo isolado que se liga especificamente ao mesmo epítipo da CTLA-4 humano do que qualquer anticorpo da presente invenção. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítipo localizado dentro de uma região de CTLA-4 humano consistindo em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NO: 34-39. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítipo localizado dentro de uma região da CTLA-4 humano que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 37. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítipo localizado

dentro de uma região da CTLA-4 humano que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 36. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítopo localizado dentro de uma região de CTLA-4 humano que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 35. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítopo localizado dentro de uma região da CTLA-4 humano que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 34. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítopo localizado dentro de uma região de CTLA-4 humano que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 38. Em certas modalidades, o anticorpo liga-se a um epítopo localizado dentro de uma região de CTLA-4 humano que consiste na sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 39.

[0027] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo que, quando ligado a uma proteína CTLA-4 humano ou um fragmento do mesmo, por exemplo, que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 37-162 da SEQ ID NO: 33, reduz a troca de hidrogênio/deutério em uma região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 34 em relação à troca de hidrogênio/deutério na região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 34 na ausência do anticorpo, conforme determinado por uma sequência de aminoácidos. ensaio de hidrogênio/deutério. Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo que, quando ligado a uma proteína CTLA-4 humano ou um fragmento do mesmo, por exemplo, que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 37-162 da SEQ ID NO: 33, reduz a troca de hidrogênio/deutério em uma região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 35 em relação à troca de hidrogênio/deutério na região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 35 na ausência do anticorpo, como determinado por um ensaio de hidrogênio/deutério. Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo que, quando ligado a uma proteína CTLA-4 humano ou um fragmento do mesmo, por exemplo, que compreende a

sequência de aminoácidos dos resíduos 37-162 da SEQ ID NO: 33, reduz a troca de hidrogênio/deutério em uma região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 36 em relação à troca de hidrogênio/deutério na região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 36 na ausência do anticorpo, conforme determinado por uma sequência de aminoácidos. ensaio de hidrogênio/deutério. Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo que, quando ligado a uma proteína CTLA-4 humano ou um fragmento do mesmo, por exemplo, que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 37-162 da SEQ ID NO: 33, reduz a troca de hidrogênio/deutério em uma região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 37 em relação à troca de hidrogênio/deutério na região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 37 na ausência do anticorpo, conforme determinado por uma sequência de aminoácidos. ensaio de hidrogênio/deutério. Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo que, quando ligado a uma proteína CTLA-4 humano ou um fragmento do mesmo, por exemplo, que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 37-162 da SEQ ID NO: 33, reduz a troca de hidrogênio/deutério em uma região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 38 em relação à troca de hidrogênio/deutério na região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 38 na ausência do anticorpo, como determinado por um ensaio de hidrogênio/deutério. Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo que, quando ligado a uma proteína CTLA-4 humano ou um fragmento do mesmo, por exemplo, que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 37-162 da SEQ ID NO: 33, reduz a troca de hidrogênio/deutério em uma região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 39 em relação à troca de hidrogênio/deutério na região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 39 na ausência do anticorpo, como determinado por um ensaio de hidrogênio/deutério.

[0028] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um anticorpo ou anticorpo isolado que se liga especificamente ao mesmo epítopo da CTLA-4 humano do que qualquer anticorpo da presente invenção. Em certas modalidades, o anticorpo, quando ligado a uma proteína CTLA-4 humano ou um fragmento do mesmo, por exemplo, que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 37-162 da SEQ ID NO: 33, reduz a troca de hidrogênio/deutério em uma região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 34 em relação à troca de hidrogênio/deutério na região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 34 na ausência do anticorpo, conforme determinado por um ensaio de hidrogênio/deutério. Em certas modalidades, o anticorpo, quando ligado a uma proteína CTLA-4 humano ou um fragmento do mesmo, por exemplo, que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 37-162 da SEQ ID NO: 33, reduz a troca de hidrogênio/deutério em uma região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 35 em relação à troca de hidrogênio/deutério na região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 35 na ausência do anticorpo, conforme determinado por um ensaio de hidrogênio/deutério. Em certas modalidades, o anticorpo, quando ligado a uma proteína CTLA-4 humano ou um fragmento do mesmo, por exemplo, que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 37-162 da SEQ ID NO: 33, reduz a troca de hidrogênio/deutério em uma região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 36 em relação à troca de hidrogênio/deutério na região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 36 na ausência do anticorpo, como determinado por um ensaio de hidrogênio/deutério. Em certas modalidades, o anticorpo, quando ligado a uma proteína CTLA-4 humano ou um fragmento do mesmo, por exemplo, que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 37-162 da SEQ ID NO: 33, reduz a troca de hidrogênio/deutério em uma região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 37

relativamente à troca de hidrogênio/deutério na região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 37 na ausência do anticorpo, conforme determinado por um ensaio de hidrogênio/deutério. Em certas modalidades, o anticorpo, quando ligado a uma proteína CTLA-4 humano ou um fragmento do mesmo, por exemplo, que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 37-162 da SEQ ID NO: 33, reduz a troca de hidrogênio/deutério em uma região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 38 em relação à troca de hidrogênio/deutério na região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 38 na ausência do anticorpo, conforme determinado por um ensaio de hidrogênio/deutério. Em certas modalidades, o anticorpo, quando ligado a uma proteína CTLA-4 humano ou um fragmento do mesmo, por exemplo, que compreende a sequência de aminoácidos dos resíduos 37-162 da SEQ ID NO: 33, reduz a troca de hidrogênio/deutério em uma região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 39 em relação à troca de hidrogênio/deutério na região que consiste na sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 39 na ausência do anticorpo, conforme determinado por um ensaio de hidrogênio/deutério.

[0029] Em certas modalidades, o anticorpo é um anticorpo humano. Em certas modalidades, o anticorpo é um anticorpo biespecífico.

[0030] Em certas modalidades, o anticorpo é antagonista ao CTLA-4 humano. Em certas modalidades, o anticorpo desativa, reduz ou inibe uma atividade de CTLA-4 humano. Em certas modalidades, o anticorpo inibe a ligação de CTLA-4 humano a CD80 humano ou CD86 humano. Em certas modalidades, o anticorpo induz a produção de IL-2 por células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) estimuladas com enterotoxina estafilocócica A (SEA).

[0031] Em certas modalidades, o anticorpo é conjugado com um agente citotóxico, agente citostático, toxina, radionuclídeo ou marcador detectável.

[0032] Em certas modalidades, o resíduo de aminoácido N-terminal da região variável da cadeia pesada e/ou da região variável da cadeia leve do anticorpo foi convertido em piroglutamato.

[0033] Em uma modalidade, a presente invenção se refere a um anticorpo da presente invenção para utilização como medicamento.

[0034] Em uma modalidade, a presente invenção se refere à utilização de um anticorpo da presente invenção para a preparação de composições farmacêuticas ou medicamentos para imunoterapia. Em certas modalidades, a imunoterapia é para aumentar a ativação de células T em resposta a um antígeno em um indivíduo, opcionalmente para tratar câncer, ou tratar ou prevenir doenças infecciosas.

[0035] Em uma modalidade, a presente invenção se refere a um anticorpo da presente invenção para utilização como diagnóstico.

[0036] Em uma modalidade, a presente invenção se refere à utilização de um anticorpo da presente invenção para detecção in vitro de CTLA-4 humano em uma amostra biológica.

[0037] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento e um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

[0038] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um polinucleotídeo isolado que codifica uma cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo descrito no presente documento. Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um vetor que compreende o polinucleotídeo. Em um outro aspecto, a presente revelação fornece uma célula hospedeira recombinante que compreende o polinucleotídeo ou o vetor. Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um método para produzir um anticorpo

que se liga a CTLA-4 humano, em que o método compreende cultivar a célula hospedeira de modo que o polinucleotídeo seja expresso e o anticorpo seja produzido.

[0039] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um método para aumentar a ativação de células T em resposta a um antígeno em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento. Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um método de tratamento do câncer em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento. Em certas modalidades, o indivíduo tem câncer. Em certas modalidades, o indivíduo tem um tumor metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido). Em certas modalidades, o câncer é tratado de acordo com um método descrito no presente documento como uma primeira terapia de câncer após o diagnóstico do tumor metastático ou localmente avançado (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas ou 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico). Em certas modalidades, o câncer é tratado de acordo com um método descrito no presente documento como a primeira terapia do câncer após o diagnóstico da progressão do tumor (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico de progressão tumoral) que ocorreu apesar do tratamento prévio do tumor com uma terapia de câncer diferente, opcionalmente método descrito no presente documento é fornecido como a segunda terapia de câncer administrada. Em certas modalidades, o câncer é tratado de acordo com um método descrito no presente documento como a primeira terapia de câncer após o diagnóstico de toxicidade de uma terapia de câncer diferente (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico da toxicidade da diferente terapia de câncer), opcionalmente, em

que o modo descrito no presente documento fornecido como a segunda terapia de câncer administrada. Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é um câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) para o qual não existe terapia padrão disponível. Em outras modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é um câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) para o qual uma terapia padrão falhou (isto é, o câncer progrediu após a terapia padrão). Em certas modalidades, uma terapia falha se o câncer for refratário à terapia. Em certas modalidades, uma terapia falha se o câncer recair após responder, total ou parcialmente, à terapia. Em certas modalidades, o câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) foi confirmado histológica ou citologicamente.

[0040] Em certas modalidades, o câncer expressa PD-L1. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1% (por exemplo, pelo menos 2%, 3%, 4 %, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%). Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 5%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 25%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer que exibe

expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 50%.

[0041] Em certas modalidades, o tumor metastático ou localmente avançado expressa PD-L1. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do tumor metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1% (por exemplo, pelo menos 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%). Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do tumor metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do tumor metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 5%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do tumor metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 25%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do tumor metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 50%.

[0042] Em certas modalidades, o câncer é um câncer do colo do útero. Em certas modalidades, o câncer é um câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido). Em certas modalidades, o câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) é um carcinoma de células escamosas metastático ou localmente avançado, irressecável, carcinoma adeno-escamoso ou adenocarcinoma do colo do útero. Em certas modalidades, não está disponível nenhuma terapia padrão para o

câncer (por exemplo, câncer do colo do útero) ou tumor metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido). Em certas modalidades, o câncer (por exemplo, câncer do colo do útero) ou tumor metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) é refratário a uma terapia padrão. Em certas modalidades, o câncer (por exemplo, câncer do colo do útero) ou tumor metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) recaiu após uma terapia padrão. Em certas modalidades, a terapia padrão compreende uma quimioterapia contendo platina. Em certas modalidades, a terapia padrão é um duplete contendo platina. Em certas modalidades, o câncer (por exemplo, câncer do colo do útero) é um carcinoma de células escamosas metastático ou localmente avançado, irressecável, carcinoma adenoescamoso ou adenocarcinoma do colo do útero que recaiu após um duplete contendo platina administrado para tratamento de doença avançada (recorrente, irressecável). ou metastática). Em certas modalidades, o câncer (por exemplo, câncer do colo do útero) ou tumor metastático ou localmente avançado é o HPV positivo. Em certas modalidades, o câncer ou tumor sólido metastático ou localmente avançado é câncer da cabeça e pescoço, melanoma, carcinoma das células renais, carcinoma urotelial ou carcinoma endometrial. Em certas modalidades, o câncer (por exemplo, câncer do colo do útero) ou tumor sólido metastático ou localmente avançado está associado à instabilidade do microssatélite.

[0043] Em certas modalidades, o indivíduo tem câncer do colo do útero (por exemplo, um carcinoma de células escamosas metastático ou localmente avançado, irressecável, carcinoma adenoescamoso ou adenocarcinoma do colo do útero) e o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anti-CTLA-4 anticorpo descrito no presente documento, por exemplo, AGEN 1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4 como uma primeira terapia de câncer após o diagnóstico do câncer do colo do útero (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas,

ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico), opcionalmente em que o anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, por ex. AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4 administrada na dosagem e frequência selecionadas do grupo que consiste em 0,3 mg/kg a cada quatro semanas, 1 mg/kg a cada quatro semanas, 3 mg/kg a cada quatro semanas, 0,3 mg/kg a cada seis semanas, 1 mg/kg a cada seis semanas, 3 mg/kg a cada seis semanas, 0,3 mg/kg a cada doze semanas, 1 mg/kg a cada doze semanas e 3 mg/kg a cada doze semanas. Em certas modalidades, o indivíduo tem câncer do colo do útero (por exemplo, um carcinoma de células escamosas metastático ou localmente avançado, irresssecável, carcinoma adenoescamoso ou adenocarcinoma do colo do útero) e o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma combinação terapêutica que compreende uma anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, por exemplo, AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4 e pembrolizumab como uma primeira terapia de câncer após diagnóstico do câncer do colo do ero (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico), opcionalmente em que o anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, por exemplo, AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4, administrada na dosagem e frequência selecionada do grupo que consiste em 0,3 mg/kg a cada quatro semanas, 1 mg/kg a cada quatro semanas 3 mg/kg a cada quatro semanas, 0,3 mg/kg a cada seis semanas, 1 mg/kg a cada seis semanas, 3 mg/kg a cada seis semanas, 0,3 mg/kg a cada doze semanas, 1 mg/kg a cada doze semanas e 3 mg/kg a cada doze semanas e pembrolizumab é administrado em 200 mg a cada três semanas.

[0044] Em certas modalidades, o câncer é um câncer do pulmão de células não pequenas (NSCLC). Em certas modalidades, o NSCLC

é um NSCLC de estágio IV. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1% (por exemplo, pelo menos 2%, 3%, 4 %, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%). Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 5%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 25%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 50%. Em certas modalidades, o NSCLC não possui aberrações do tumor genômico de EGFR ou ALK. Em certas modalidades, o NSCLC metastático ou localmente avançado não tem mutação sensibilizadora de EGFR (por exemplo, mutação que é susceptível ao tratamento com um inibidor de tirosina quinase incluindo erlotinib, gefitinib ou afatanib) ou translocação de ALK. Em certas modalidades, o indivíduo não recebeu nenhum tratamento prévio de quimioterapia sistêmica para NSCLC.

[0045] Em certas modalidades, o tumor sólido metastático ou localmente avançado é um câncer do pulmão de células não pequenas metastático ou localmente avançado (NSCLC). Em certas modalidades, o tumor sólido metastático ou localmente avançado é um câncer do pulmão de células não pequenas metastático (NSCLC). Em certas modalidades, o tumor sólido metastático ou localmente avançado é um NSCLC

de Estágio IV, metastático ou localmente avançado. Em certas modalidades, o tumor sólido metastático ou localmente avançado é um NSCLC metastático de Estágio IV. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1% (por exemplo, pelo menos 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%). Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 5%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 25%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 50%. Em certas modalidades, o NSCLC metastático ou localmente avançado não tem aberrações do tumor genômico de EGFR ou ALK. Em certas modalidades, o indivíduo não recebeu nenhum tratamento prévio de quimioterapia sistêmica para NSCLC avançado metastático ou localmente avançado.

[0046] Em certas modalidades, o indivíduo tem NSCLC (por exemplo, estágio IV, NSCLC metastático ou localmente avançado), opcionalmente em que a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC que exibe expressão detectável (por exemplo, expressão de

membrana, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%, e o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, por exemplo, AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4, como uma primeira terapia de câncer após o diagnóstico do câncer do colo do útero (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico), opcionalmente em que o anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, por exemplo, AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4, administrada na dosagem e frequência selecionada do grupo que consiste em 0,3 mg/kg a cada quatro semanas, 1 mg/kg a cada quatro semanas 3 mg/kg a cada quatro semanas, 0,3 mg/kg a cada seis semanas, 1 mg/kg a cada seis semanas, 3 mg/kg a cada seis semanas, 0,3 mg/kg a cada doze semanas, 1 mg/kg a cada doze semanas e 3 mg/kg a cada doze semanas. Em certas modalidades, o indivíduo tem NSCLC (por exemplo, estágio IV, NSCLC metastático ou localmente avançado), opcionalmente em que a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC que exibe expressão detectável (por exemplo, expressão de membrana, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%, e o método compreende administrar ao indivíduo uma combinação terapêutica que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, por exemplo, AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4 e pembrolizumab como uma primeira terapia de câncer após diagnóstico do câncer do colo do útero (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico), opcionalmente, em que o anticorpo anti-CTLA-4 descrito no

presente documento, por exemplo, AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4, administrada na dosagem e frequência selecionada do grupo que consiste em 0,3 mg/kg a cada quatro semanas, 1 mg/kg a cada quatro semanas 3 mg/kg a cada quatro semanas, 0,3 mg/kg a cada seis semanas, 1 mg/kg a cada seis semanas, 3 mg/kg a cada seis semanas, 0,3 mg/kg a cada doze semanas, 1 mg/kg a cada doze semanas e 3 mg/kg a cada doze semanas e pembrolizumab é administrado em 200 mg a cada três semanas.

[0047] Em certas modalidades, o câncer é um carcinoma de células escamosas cutâneo (cSCC). Em certas modalidades, o tumor sólido metastático ou localmente avançado é um carcinoma de células escamosas cutâneo do Estágio IV (cSCC). Em certas modalidades, o cSCC é diagnosticado histológica ou citologicamente de acordo com a oitava edição do manual do American Joint Committee on Cancer staging. Em certas modalidades, o cSCC não é curável com terapia de radiação. Em certas modalidades, o indivíduo tem cSCC (por exemplo, csCC de Estágio IV) e o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, por exemplo, AGEN 1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4, como uma primeira terapia de câncer após o diagnóstico do cSCC (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico), opcionalmente em que o anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, por ex. AGEN 1884H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4, administrada na dosagem e frequência selecionadas do grupo que consiste em 0,3 mg/kg a cada quatro semanas, 1 mg/kg a cada quatro semanas 3 mg/kg a cada quatro semanas, 0,3 mg/kg a cada seis semanas, 1 mg/kg a cada seis semanas, 3 mg/kg a cada seis semanas, 0,3 mg/kg a cada doze semanas, 1 mg/kg a cada doze semanas e 3 mg/kg a cada doze semanas. Em certas

modalidades, o indivíduo tem cSCC (por exemplo, csCC de Estágio IV) e o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de uma combinação terapêutica que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, por exemplo, AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4 e pembrolizumab como uma primeira terapia de câncer após o diagnóstico do cSCC (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico), opcionalmente em que o anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento por exemplo, AGEN 1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4, administrada na dosagem e frequência selecionada do grupo que consiste em 0,3 mg/kg a cada quatro semanas, 1 mg/kg a cada quatro semanas 3 mg/kg a cada quatro semanas, 0,3 mg/kg a cada seis semanas, 1 mg/kg a cada seis semanas, 3 mg/kg a cada seis semanas, 0,3 mg/kg a cada doze semanas, 1 mg/kg a cada doze semanas e 3 mg/kg a cada doze semanas e pembrolizumab é administrado em 200 mg a cada três semanas.

[0048] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado por via intravenosa. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intravenosamente a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, ou 10 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez cada duas semanas. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intravenosamente a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, ou 10 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez cada três semanas. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intravenosamente a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, ou

10 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez cada quatro semanas. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intravenosamente a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, ou 10 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez cada seis semanas. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intravenosamente a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, ou 10 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez cada doze semanas. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intratumoralmente. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intratumoralmente a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg ou 3 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez a cada três semanas. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intratumoralmente a 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg ou 0,3 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez a cada três semanas. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intratumoralmente a uma dose que é até 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes, 100 vezes, ou 200 vezes menor que a dose administrada sistemicamente. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intratumoralmente a uma dose que é até 10 vezes inferior à dose administrada sistemicamente. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intratumoralmente a uma dose até 100 vezes inferior à dose administrada sistemicamente. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou a composição farmacêutica descrita no presente documento é administrada (por

exemplo, intratumoral ou sistemicamente) como uma monoterapia. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intratumoralmente e o método compreende ainda a administração de um agente terapêutico adicional ao indivíduo. Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional é administrado sistemicamente. Em certas modalidades, o indivíduo tem um tumor sólido e o agente terapêutico adicional é um anticorpo anti-PD-1. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é pembrolizumab ou nivolumab. Em certas modalidades, o pembrolizumab é administrado em uma dose de 200 mg a cada três semanas. Em certas modalidades, o indivíduo tem carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e o agente terapêutico adicional é um anticorpo anti-EGFR. Em certas modalidades, o anticorpo anti-EGFR é cetuximab. Em certas modalidades, o indivíduo tem câncer da mama HER2+ e o agente terapêutico adicional é um anticorpo anti-HER2. Em certas modalidades, o anticorpo anti-HER2 é trastuzumab. Em certas modalidades, estes métodos compreendem ainda a administração de um agente quimioterápico ao indivíduo. Em certas modalidades, o agente quimioterápico é administrado sistemicamente. Em certas modalidades, o agente quimioterápico é gemcitabina. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intratumoralmente e o indivíduo tem um tumor sólido avançado ou metastático. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intratumoralmente e o indivíduo tem câncer da cabeça e pescoço (por exemplo, carcinoma de células escamosas de cabeça e de pescoço recidivado/refratário). Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado intratumoralmente e o indivíduo tem câncer da mama (por exemplo, câncer da mama HER2+ recidivado/refratário). Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é entregue a um nódulo linfático de drenagem

tumoral. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado através de uma administração localizada (por exemplo, administração subcutânea). Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado através de uma administração localizada (por exemplo, administração subcutânea) a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg ou 3 mg/kg. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado através de uma administração localizada (por exemplo, administração subcutânea) a uma dose que é até 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 30 vezes., 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes, 100 vezes, ou 200 vezes menos que a dose administrada sistemicamente. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado através de uma administração localizada (por exemplo, administração subcutânea) a uma dose que é até 10 vezes inferior à dose administrada sistemicamente. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado através de uma administração localizada (por exemplo, administração subcutânea) a uma dose até 100 vezes inferior à dose administrada sistemicamente. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado através de uma administração localizada (por exemplo, administração subcutânea) e o método compreende ainda a administração de um agente terapêutico adicional ao indivíduo. Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional é uma vacina. Em certas modalidades, a vacina compreende um complexo de peptídeo de proteína de choque térmico (HSPPC) que compreende uma proteína de choque térmico complexada com um peptídeo antigênico. Em uma modalidade, a proteína de choque térmico é a proteína gp96 e é complexada com um peptídeo antigênico associado a um tumor, em que a HSPPC é derivada de um tumor obtido de um indivíduo. Em

certas modalidades, a proteína de choque térmico é selecionada do grupo que consiste em hsc70, hsp70, hsp90, hspl10, grpl70, gp96, calreticulina, um mutante da mesma e combinações de dois ou mais das mesmas. Em certas modalidades, a proteína de choque térmico é hsc70. Em certas modalidades, a proteína de choque térmico é hsp70. Em certas modalidades, o peptídeo antigênico é sintético. Em certas modalidades, o indivíduo tem câncer. Em certas modalidades, o indivíduo tem uma doença infecciosa. Em certas modalidades, estes métodos compreendem adicionalmente a administração de um agente terapêutico adicional ao indivíduo. Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional é um agente quimioterápico ou de direcionamento de ponto de verificação. Em certas modalidades, o agente de direcionamento de ponto de verificação é selecionado do grupo que consiste em um anticorpo antagonista anti-PD-1, um anticorpo antagonista anti-PD-L1, um anticorpo antagonista anti-PD-L2, um anticorpo antagonista anti-CTLA-4, um anticorpo antagonista anti-TIM-3, um anticorpo antagonista anti-LAG-3, um anticorpo antagonista anti-CEACAM1, um anticorpo agonista anti-GITR, um anticorpo agonista anti-OX40 e um anticorpo agonista anti-CD 137, um anticorpo agonista anti-DR3, um anticorpo agonista anti-TNFSF14 e um anticorpo agonista anti-CD27. Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional é radioterapia. Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional é um inibidor da indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO). Inibidores de IDO adequados incluem, sem limitação, epacadostat, F001287, indoximod e NLG919. Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional é uma vacina. Em certas modalidades, a vacina compreende um complexo de peptídeo de proteína de choque térmico (HSPPC) que compreende uma proteína de choque térmico complexada com um peptídeo antigênico. Numa modalidade, a proteína de choque térmico é a proteína gp96 e é complexada com um peptídeo antigênico associado a tumor, em que a HSPPC é derivada de um tumor obtido de um indivíduo.

[0049] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um método de tratamento de uma doença infecciosa em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento. Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um método de prevenção de uma doença infecciosa em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento.

[0050] Em uma modalidade, a presente invenção se refere a um anticorpo da presente invenção, um polinucleotídeo da invenção, um vetor da invenção e/ou uma célula hospedeira recombinante da invenção, para utilização como medicamento.

[0051] Em uma modalidade, a presente invenção se refere a um anticorpo da presente invenção, um polinucleotídeo da invenção, um vetor da invenção e/ou uma célula hospedeira recombinante da invenção, para utilização como diagnóstico.

[0052] Em uma modalidade, a presente invenção se refere à utilização de um anticorpo da presente invenção, um polinucleotídeo da invenção, um vetor da invenção e/ou uma célula hospedeira recombinante da invenção, para a detecção in vitro de CTLA-4 humanos em uma amostra biológica.

[0053] Em um aspecto, é fornecida no presente documento uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento e um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável, para utilização como um medicamento.

[0054] Em um aspecto, é fornecida no presente documento uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento e um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável, para utilização como diagnóstico.

[0055] Em um aspecto, é fornecida no presente documento uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, um polinucleotídeo da invenção, um vetor da invenção e/ou uma célula hospedeira recombinante da invenção e um carreador farmacêuticamente aceitável ou excipiente. Em um aspecto, a composição farmacêutica é para utilização como medicamento e/ou diagnóstico.

[0056] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção, para utilização em um método para aumentar a ativação de células T em resposta a um antígeno.

[0057] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção, para utilização em um método para aumentar a ativação de células T em resposta a um antígeno em um indivíduo.

[0058] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção, para utilização em um método para aumentar a ativação de células T em resposta a um antígeno em um indivíduo que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da invenção.

[0059] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção, para utilização em um método para o tratamento de câncer.

[0060] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou

composição farmacêutica da presente invenção, para utilização em um método para o tratamento de câncer em um indivíduo.

[0061] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção, para utilização em um método para o tratamento de câncer em um indivíduo, que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade de um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da invenção.

[0062] Em um aspecto, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um agente terapêutico adicional, preferencialmente um anticorpo anti-PD-1, para utilização como medicamento.

[0063] Em um aspecto, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um agente terapêutico adicional, preferencialmente um anticorpo anti-PD-1, para utilização em um método para o tratamento do câncer. Em uma modalidade preferencial, o câncer é um tumor sólido. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção é administrado intratumoralmente ao indivíduo, preferivelmente administrado intratumoralmente ao indivíduo a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg ou 3 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez a cada três semanas.

[0064] Em um aspecto, a presente invenção se refere a uma composição farmacêutica, kit ou kit-de-partes que compreende (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um adicional agente terapêutico, de preferência, um anticorpo anti-PD-1.

[0065] Em um aspecto, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um anticorpo anti-EGFR, e opcionalmente (c) um agente quimioterápico, para utilização como medicamento.

[0066] Em um aspecto, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um anticorpo anti-EGFR, e opcionalmente (c) um agente quimioterápico, para utilização em um método para o tratamento do câncer. Em uma modalidade preferencial, o câncer é um carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção é administrado intratumoralmente ao indivíduo, preferivelmente administrado intratumoralmente ao indivíduo a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg ou 3 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez a cada três semanas.

[0067] Em um aspecto, a presente invenção se refere a uma composição farmacêutica, kit ou kit-de-partes que compreende (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um -IFFR e, opcionalmente, (c) um agente quimioterápico.

[0068] Em um aspecto, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um anticorpo anti-HER2, e opcionalmente (c) um agente quimioterápico, para utilização como medicamento.

[0069] Em um aspecto, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um anticorpo anti-HER2,

e opcionalmente (c) um agente quimioterápico, para utilização em um método para o tratamento do câncer de mama HER2+. Em outra modalidade preferencial, o anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção é administrado intratumoralmente ao indivíduo, preferivelmente administrado intratumoralmente ao indivíduo a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg ou 3 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez a cada três semanas.

[0070] Em um aspecto, a presente invenção se refere a uma composição farmacêutica, kit ou kit-de-partes que compreende (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um anticorpo anti-HER2, e opcionalmente (c) um agente quimioterápico.

[0071] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção, para utilização em um método para o tratamento de câncer, em que o anticorpo, polinucleotídeo, vetor, recombinante célula hospedeira e/ou composição farmacêutica da presente invenção é administrada intratumoralmente ao indivíduo, preferivelmente administrada intratumoralmente ao indivíduo a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, ou 3 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez a cada três semanas.

[0072] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção, para utilização em um método para o tratamento de câncer, em que o anticorpo, polinucleotídeo, vetor, recombinante célula hospedeira e/ou composição farmacêutica da presente invenção administrada subcutaneamente ou intravenosamente ao indivíduo, de preferência, administrada intravenosamente ao indivíduo a 0,01 mg/kg, 0,03

mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg ou 10 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez a cada três semanas.

[0073] Em um aspecto, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um agente terapêutico adicional, para utilização como medicamento. Em uma modalidade preferencial, o agente terapêutico adicional é um agente quimioterápico ou um agente direcionado para o ponto de verificação ou um inibidor da indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) ou uma vacina.

[0074] Em um aspecto, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um agente terapêutico adicional, para utilização em um método para o tratamento de câncer. Em uma modalidade preferencial, o agente terapêutico adicional é um agente quimioterápico ou um agente direcionado para o ponto de verificação ou um inibidor da indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) ou uma vacina.

[0075] Em um aspecto, a presente invenção se refere a uma composição farmacêutica, kit ou kit-de-partes que compreende (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um adicional agente terapêutico. Em uma modalidade preferencial, o agente terapêutico adicional é um agente quimioterápico ou um agente direcionado para o ponto de verificação ou um inibidor da indolamina-2,3-dioxigenase (IDO) ou uma vacina.

[0076] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção, para utilização em um método para o tratamento de câncer, e/ou para utilização em um método para aumento da ativação de células T em resposta a um antígeno, em que o anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição

farmacêutica da presente invenção entregue a um nódulo linfático que drena tumores.

[0077] Em um aspecto, a presente invenção se refere à utilização de um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção em um método para o tratamento de câncer, e/ou em um método para aumentar a ativação de células T em resposta a um antígeno em um indivíduo, em que o anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção é entregue a um nódulo linfático que drena tumores.

[0078] Em um aspecto, o presente invento se refere à utilização de um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção, para preparar medicamentos para imunoterapia, por exemplo, para aumentar a ativação de células T em resposta a um antígeno em um indivíduo, tratamento de câncer ou tratamento ou prevenção de doenças infecciosas.

[0079] Em um aspecto, o presente invento se refere à utilização de um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção, para preparar medicamentos para imunoterapia, por exemplo, para aumentar a ativação de células T em resposta a um antígeno em um indivíduo, tratamento de câncer, ou tratamento ou prevenção de doenças infecciosas, em que o anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção são administrados a um nódulo linfático drenante de tumor.

[0080] Em um aspecto, a presente invenção se refere à utilização de (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um anticorpo anti-HER2, e opcionalmente (c) um agente quimioterápico, para preparar um medicamento para imunoterapia, por exemplo, para aumentar a

ativação de células T em resposta a um antígeno em um indivíduo, tratamento de câncer ou tratamento ou prevenção de doenças infecciosas.

[0081] Em um aspecto, a presente invenção se refere à utilização de (a) um anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção e (b) um anticorpo anti-HER2, e opcionalmente (c) um agente quimioterápico, para preparar um medicamento para imunoterapia, por exemplo, para aumentar a ativação de células T em resposta a um antígeno em um indivíduo, tratar câncer, ou tratar ou prevenir doenças infecciosas, em que o anticorpo, polinucleotídeo, vetor, célula hospedeira recombinante e/ou composição farmacêutica da presente invenção é entregue a um nódulo linfático de drenagem tumoral.

5. BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0082] As Figuras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F e 1G são histogramas de citometria de fluxo mostrando a ligação de anticorpos anti-CTLA-4 ou um anticorpo de controle de isótipo IgG1 a células Jurkat manipuladas para expressar CTLA-4 humano na superfície celular. Os anticorpos anti-CTLA-4 testados são: AGEN1884.H1.1 (IgG1), AGEN1884.H1.2 (IgG1), AGEN1884.H1.3 (IgG1), AGEN1884.H2.1 (IgG1), AGEN1884.H2.2 (IgG1), AGEN1884.H2.3 (IgG1) e

[0083] A Figura 2 é um gráfico que mostra a produção de PBMC humanas de IL-2 após incubação sob estimulação subótima com o superantígeno Enterotoxina Estafilocócica A (SEA) na ausência ou presença do anticorpo anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1) ou um anticorpo de controle de isótipo (IgG1). Réplicas de oito foram realizadas para cada grupo e os valores médios das oito réplicas são indicados com uma barra preta.

[0084] A Figura 3 é um gráfico mostrando os resultados de um ensaio repórter de IL-2-luciferase demonstrando que o bloqueio de CTLA-4 conduz à ativação de células T. A resposta de dobramento da expressão da luciferase, um marcador substituto para a ativação do gene da IL-

2, é representada em uma faixa de concentrações de anticorpos para AGEN1884.H3 (IgG1) ou um anticorpo de controle de isótipo (IgG1).

[0085] A Figura 4 é um gráfico mostrando os resultados de um ensaio repórter em que o engajamento simultâneo de AGEN1884.H3 (IgG1) para as células-alvo (via ligação CTLA-4) e células efectoras (via ligação FcγRIIIA) desencadeia a expressão de luciferase pela linha de células efectoras. A atividade da luciferase é um marcador substituto para a sinalização de FcγRIIIA. A resposta de dobragem dos valores RLU é representada por uma faixa de concentrações de anticorpos para AGEN1884.H3 (IgG1) e um anticorpo de controle de isótipo (IgG1).

[0086] As Figuras 5A, 5B, 5C e 5D são histogramas de citometria de fluxo mostrando células Jurkat que expressam CTLA-4 incubadas com o anticorpo anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1), AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/I332E), AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou AGEN1884.H3 (IgG1 L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L), ou um anticorpo de controle de isótipo. A ligação do anticorpo foi detectada utilizando um anticorpo secundário conjugado com fluorocromo.

[0087] As Figuras 6A e 6B são gráficos que mostram o bloqueio da ligação entre o CTLA-4 humano e os seus ligantes, CD80 e CD86, respectivamente, por AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E). Células Jurkat manipuladas para expressar constitutivamente CTLA-4 humano foram incubadas com o anticorpo anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG S239D/A330E/I332E), um anticorpo de referência anti-CTLA-4 ou um anticorpo de controle de isótipo (IgG1) e depois manchadas com o ligante marcado com fluorescência indicado. A ligação do ligante foi então avaliada por citometria de fluxo.

[0088] As Figuras 7A, 7B e 7C são gráficos mostrando a produção de IL-2 de PBMC humanas primárias cultivadas sob estimulação subótima com o superantígeno de AAE na ausência ou presença de um anticorpo de controle do isótipo (IgG1) ou um anticorpo anti-CTLA-4. As

Figuras 7A e 7B são gráficos mostrando a produção de IL-2 estimulada por uma dose única ou uma titulação de dose do anticorpo de controle do isótipo (IgG1) ou dos anticorpos anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1), AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/I332E), AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E) e AGEN1884.H3 (IgG1 L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L). No estudo mostrado na Figura 7B, além do anticorpo de controle do isótipo (IgG1) ou do anticorpo anti-CTLA-4, as células de cada amostra foram também incubadas com um anticorpo de controle do isótipo IgG4S228P. A Figura 7C é um gráfico que mostra a produção de IL-2 estimulada por uma titulação de dose do anticorpo de controle de isótipo (IgG1) ou os anticorpos anti-CTLA-4 AGEN1884 (IgG1), AGEN1884 (IgG1 S239D/I332E), AGEN1884 (IgG1 S239D/A330L/I332E) e AGEN1884 afucosilada.

[0089] A Figura 8A é uma análise de imunotransferência para ZAP70 fosforilada (Y493) em PBMCs após estimulação com 50 ng/ml de superantígeno de SEA e 10 µg/ml de anticorpo de controle do isótipo (IgG1) ou anticorpos anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1), AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou AGEN1884.H3 (IgG1 N297A). A Figura 8B é um gráfico que mostra a análise densitométrica normalizada dos dados mostrados na Figura 8A.

[0090] As Figuras 9A, 9B, 9C e 9D são gráficos que mostram a eficácia antitumoral e a depleção de células T reguladoras intratumorais (Treg) induzida por variantes Fc do anticorpo anti-CTLA-4 murino 9D9. A Figura 9A mostra o crescimento do tumor em camundongos CT26 após tratamento de dose única com anticorpo 9D9 murino anti-CTLA-4 (mIgG2a), uma variante silenciosa Fc do anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A), uma variante Fc de anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) ou um anticorpo de controle do isótipo (mIgG2a). O painel superior mostra o volume mediano do tumor ao longo do tempo para cada grupo de tratamento. Os restantes painéis mostram o volume do tumor ao longo do tempo para animais individuais em cada grupo de tratamento. A Figura 9B mostra o efeito

do tratamento com anticorpo anti-CTLA-4 em populações de células T de infiltrados tumorais colhidos de camundongos tratados com doses únicas de anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a), anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A), anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E), ou anticorpo de controle do isótipo (mIgG2a). Os infiltrados tumorais foram colhidos e analisados por citometria de fluxo nos momentos indicados após a injeção com anticorpo. As populações celulares analisadas incluem: FoxP3+ Tregs (painel superior esquerdo), CD45+ leucócitos (painel superior direito) e CD + não Tregs (painel inferior esquerdo). O painel inferior direito mostra a proporção de células T CD8+ para Tregs observadas em infiltrados tumorais. A Figura 9C mostra populações FoxP3 + Treg ao longo do tempo em nódulos linfáticos de drenagem tumoral colhidos de camundongos tratados conforme descrito para a Figura 9B. A Figura 9D mostra a mudança de dobragem em FoxP3 + Tregs esplênicos 72 horas após o tratamento, conforme descrito para a Figura 9B.

[0091] A Figura 10 é uma série de gráficos que mostram a eficácia antitumoral de anticorpos anti-CTLA-4 murinos quando combinados com a vacina tumoral derivada de um tumor HPV + (antígenos virais E6/E7). São mostrados o volume do tumor ao longo do tempo para camundongos individuais que não receberam tratamento, anticorpo de controle de isótipo (mIgG2a), anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a), ou uma variante Fc do anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E). Gráficos na linha superior mostram resultados para animais que receberam apenas o tratamento de anticorpo indicado. Gráficos na linha inferior mostram resultados para animais que receberam o tratamento com anticorpo indicado em combinação com a vacina contra tumor.

[0092] As Figuras 11A e 11B são gráficos que mostram a expressão gênica e a metilação CpG de populações de células T humanas. As células T CD4+ CD25+ não reguladoras FOXP3 (Teff) e as células T reguladoras CD4 CD25+ FOXP3+ (Treg) foram isoladas do sangue periférico

de dadores saudáveis, expandidas e ativadas. A Figura 11A mostra níveis de FOXP3, CTLA-4 intracelular e CTLA-4 de membrana em cada população de células T ativada, conforme determinado por citometria de fluxo. A Figura 11B mostra o nível de metilação CpG em regiões CpG nos locais FOXP3 (painel superior) e CTLA4 (painel inferior) em células T virgens, células T efetoras ativadas e células T reguladoras ativadas, cada uma do mesmo doador.

[0093] As Figuras 12A e 12B são gráficos mostrando os ciclos de tempo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) de células alvo CTLA-4 + humanas após incubação com o anticorpo anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1) ou suas variantes Fc. Células NK-92 (expressão de FcγRIIIA V158) foram co-cultivadas com células alvo CTLA-4 + que foram incubadas com diferentes variantes Fc de anticorpos anti-CTLA-4 ou um controle do isótipo IgG1 (10 mg/ml). Microscopia de alto conteúdo de ativação da caspase 3/7 foi então usada para quantificar a atividade da ADCC. A Figura 12A mostra a atividade ADCC em células Jurkat manipuladas para expressar CTLA-4 na superfície celular, quando incubadas com AGEN1884.H3 (IgG1), AGEN1884.H3 (IgG1 N297A), AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), AGEN1884.H3 (IgG1 S267E/L328F), AGEN1884.H3 afucosilado (IgG1) ou um anticorpo de controle de isótipo (IgG1). A Figura 12B mostra a atividade de ADCC em células T efetoras ativadas humanas primárias (painel da esquerda) ou células T reguladoras (painel da direita) quando incubadas com tais anticorpos.

[0094] As Figuras 13A, 13B, 13C e 13D são gráficos que mostram os efeitos das variantes do anticorpo anti-CTLA-4 na função das células T quando administradas isoladamente ou em combinação com um anticorpo anti-PD-1. As PBMC humanas foram isoladas de dois dadores e incubadas em condições de cultura estimuladoras com o anticorpo anti-CTLA-4 AGEN 1884.H3 (IgG1), um anticorpo anti-CTLA-4 da variante Fc AGEN 1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou um anticorpo de controle de isótipo (IgG1), em combinação com um anticorpo de referência anti-PD-1 ou um

anticorpo de controle de isótipo (IgG-, como indicado). Para cada condição de tratamento listada, uma titulação de dosagem foi usada para o primeiro anticorpo listado, e uma concentração fixa (5 µg/ml) foi usada para o segundo anticorpo listado. Essa experiência foi realizada duas vezes, para um total de duas repetições por doador. Os níveis de produção de IL-2 induzidos por cada combinação de anticorpos em PBMC coletados do primeiro doador são mostrados na Figura 13A (réplica 1) e Figura 13B (réplica 2). Os níveis de produção de IL-2 induzidos por cada combinação de anticorpos em PBMC coletados do segundo doador são mostrados na Figura 13C (réplica 1) e na Figura 13D (réplica 2).

[0095] As Figuras 14A, 14B e 14C são uma série de alinhamentos de sequências. A Figura 14A é um alinhamento de sequências para CTLA-4 humano (SEQ ID NO: 33), CTLA-4 de macaco cynomolgus (SEQ ID NO: 40), CTLA-4 de murganho (SEQ ID NO: 41) e CTLA-4 de camundongo (SEQ ID NO: 42). Os pontos representam resíduos idênticos aos resíduos humanos correspondentes. Um “*” (asterisco) indica posições que possuem um único resíduo totalmente conservado. Um “.” (dois pontos) indica conservação entre grupos de propriedades fortemente similares. Um “.” (ponto) indica conservação entre grupos de propriedades fracamente similares. As Figuras 14B e 14C são alinhamentos de sequências para CTLA-4 humano (resíduos 1-144 e resíduos 145-223 de SEQ ID NO: 33, respectivamente), CTLA-4 de macaco cynomolgus (resíduos 1-144 e resíduos 145-223 de SEQ ID NO: 40, respectivamente), CD28 humano (resíduos 1-125 e resíduos 128-220 da SEQ ID NO: 43, respectivamente), ICOS humano (resíduos 1-125 e resíduos 125-199 da SEQ ID NO: 44, respectivamente), BTLA humano (resíduos 1-125 e resíduos 126-289 da SEQ ID NO: 45, respectivamente) e PD-1 humana (resíduos 1-143 e resíduos 144-288 da SEQ ID NO: 46, respectivamente). As duas regiões que mostram uma forte diminuição na absorção de deutério quando o CTLA-4 humano foi ligado a AGEN1884-Fab estão sublinhadas nas Figuras 14A -14C: resíduos 80-82 (QVT, SEQ ID NO: 39) e resíduos 135-149

(YPPPYLGLGNGTQI, SEQ ID NO: 37), numerado de acordo com a SEQ ID NO: 33.

6. DESCRIÇÃO DETALHADA

[0096] A presente revelação fornece anticorpos que se ligam especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e antagonizam a função de CTLA-4, por exemplo, imunossupressão mediada por CTLA-4. São também fornecidas composições farmacêuticas que compreende tais anticorpos, ácidos nucleicos que codificam tais anticorpos, vetores de expressão e células hospedeiras para produzir tais anticorpos e métodos de tratamento de um indivíduo utilizando tais anticorpos. Os anticorpos descritos no presente documento são particularmente úteis para aumentar a ativação de células T em resposta a um antígeno (por exemplo, um antígeno tumoral ou um antígeno de doença infecciosa) e, portanto, para tratar câncer em um indivíduo ou tratar ou prevenir uma doença infecciosa em um indivíduo. Todos os exemplos de “anticorpos isolados” descritos no presente documento são adicionalmente contemplados como anticorpos que podem ser, mas não necessariamente, isolados. Todos os exemplos de “polinucleotídeos isolados” descritos no presente documento estão adicionalmente contemplados como polinucleotídeos que podem ser, mas não necessariamente, isolados. Todos os exemplos de “anticorpos” descritos no presente documento são adicionalmente contemplados como anticorpos que podem ser, mas não necessariamente, isolados. Todos os exemplos de “polinucleotídeos” descritos no presente documento estão adicionalmente contemplados como polinucleotídeos que podem ser, mas não necessariamente, isolados.

[0097] O versado saberá que um resíduo de aminoácido de glutamato (E) ou glutamina (Q) no terminal N de uma região variável de cadeia pesada e/ou uma região variável de cadeia leve de qualquer um dos anticorpos descritos no presente documento (por exemplo, um anticorpo anti-CTLA4) pode, sob certas condições, converter-se espontaneamente em piroglutamato por ciclização pós-translacional do grupo amino livre para formar

uma lactama. Consequentemente, em certas modalidades de cada um e todos os métodos, utilizações, composições farmacêuticas ou kits descritos no presente documento, o resíduo de aminoácido N-terminal de uma ou mais regiões variáveis de cadeia pesada e/ou regiões variáveis de cadeia leve do anticorpo foi convertido em piroglutamato (por exemplo, como resultado da ciclização pós-tradução do grupo amino livre do resíduo E ou Q do terminal N).

6.1 DEFINIÇÕES

[0098] Conforme usado no presente documento, os termos “cerca de” e “aproximadamente”, quando usados para modificar um valor numérico ou intervalo numérico, indicam que desvios de 5% a 10% acima (por exemplo, até 5% a 10% acima) e 5% para 10% abaixo (por exemplo, até 5% a 10% abaixo), o valor ou intervalo permanece dentro do significado pretendido do valor ou intervalo recitado.

[0099] Conforme usado no presente documento, o termo “CTLA-4” se refere à proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos. Conforme usado no presente documento, o termo “CTLA-4 humano” se refere a uma proteína CTLA-4 humano codificada por um gene CTLA-4 humano de tipo selvagem, por exemplo, número de acesso de GenBank™ NM_005214.4 ou NM_001037631.2. Uma sequência de aminoácidos imatura exemplificativa de CTLA-4 humano é fornecida como SEQ ID NO: 33.

[0100] Conforme usado no presente documento, os termos “anticorpo” e “anticorpos” incluem anticorpos inteiros, fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos de comprimento total e moléculas que compreende CDRs de anticorpo, regiões VH ou regiões VL. Exemplos de anticorpos incluem anticorpos monoclonais, anticorpos produzidos de forma recombinante, anticorpos monoespecíficos, anticorpos multiespecíficos (incluindo anticorpos biespecíficos), anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, imunoglobulinas, anticorpos sintéticos, anticorpos tetraméricos que compreendem duas moléculas de cadeia pesada e duas cadeias leves, um anticorpo monômero de cadeia leve, um monômero de

cadeia pesada de anticorpo, um dímero de cadeia leve de anticorpo, um dímero de cadeia pesada de anticorpo, um par de cadeia pesada anticorpo-cadeia leve de anticorpo, intracorpos, anticorpos heteroconjugados, conjugados anticorpo-fármaco, anticorpos de domínio único anticorpos de cadeia ou Fvs de cadeia simples (scFv), anticorpos camelizados, corpos de anticorpos, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, anticorpos Fvs ligados por dissulfureto (sdFv), anti-idiotípicos (anti-Id) (incluindo, por exemplo, anticorpos anti-anti-id) e fragmentos de ligação ao antígeno de qualquer um dos anteriores. Em certas modalidades, os anticorpos descritos no presente documento se referem a populações de anticorpos policlonais. Os anticorpos podem ser de qualquer tipo (por exemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA ou IgY), qualquer classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 ou IgA2), ou qualquer subclasse (por exemplo, IgG ou IgG2b) da molécula de imunoglobulina. Em certas modalidades, os anticorpos descritos no presente documento são anticorpos IgG, ou uma classe (por exemplo, IgG1 ou IgG4 humana) ou subclasse da mesma. Em uma modalidade específica, o anticorpo é um anticorpo monoclonal humanizado. Em outra modalidade específica, o anticorpo é um anticorpo monoclonal humano.

[0101] Conforme usado no presente documento, os termos “região VH” e “região VL” se referem a regiões variáveis de cadeia pesada e leve de anticorpo único, respectivamente, que compreendem FR (Regiões de Estrutura) 1, 2, 3 e 4 e CDR (Regiões Determinantes de Complementaridade) 1, 2 e 3 (consulte Kabat et al., (1991) Sequences of Immunological Interest (Publicação NIH nº 91-3242, Bethesda), que é incorporada ao presente documento a título de referência em sua totalidade).

[0102] Conforme usado no presente documento, o termo “CDR” ou “região determinante de complementaridade” significa os sítios de combinação de antígeno não contíguos encontrados dentro da região variável de polipeptídeos de cadeia pesada e leve. Essas regiões particulares foram descritas por Kabat et al, J. Biol. Chem. 252, 6.609 a 6.616 (1977) e Kabat et

al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901 a 917 (1987), e por MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732 a 745 (1996), todos os quais estão incorporados ao presente documentos a título de referência em sua totalidade, onde as definições incluem sobreposição ou subconjuntos de resíduos de aminoácidos quando comparados um contra o outro. Em certas modalidades, o termo “CDR” é uma CDR conforme definido por Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6.609 a 6.616 (1977) e Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest (1991). Em certas modalidades, o termo “CDR” é uma CDR como definido por Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901 a 917 (1987). Em certas modalidades, o termo “CDR” é um CDR como definido por MacCallum et al, J. Mol. Biol. 262: 732 a 745 (1996) e Martin A. “Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains”, em Antibody Engineering, Kontermann e Diibel, eds., Capítulo 31, páginas 422 a 439, Springer-Verlag, Berlim, Alemanha (2001).

[0103] Conforme usado no presente documento, o termo “resíduos de aminoácidos de estrutura (FR)” se refere àqueles aminoácidos na região de estrutura de uma cadeia de imunoglobulina. O termo “região de estrutura” ou “região FR” conforme usado no presente documento, inclui os resíduos de aminoácidos que são parte da região variável, mas não fazem parte das CDRs (por exemplo, usando a definição de CDRs de Kabat ou Chothia).

[0104] Conforme usado no presente documento, os termos “região variável” e “domínio variável” são usados de forma intercambiável e são comuns na técnica. A região variável se refere tipicamente a uma porção de um anticorpo, geralmente, uma porção de uma cadeia leve ou pesada, tipicamente cerca do terminal amino de 110 a 125 aminoácidos na cadeia pesada madura e cerca de 90 a 115 aminoácidos na cadeia pesada madura, que diferem extensamente em sequência entre os anticorpos e são usados na ligação e especificidade de um anticorpo particular para o seu antígeno particular. A variabilidade na sequência é concentrada naquelas

regiões denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDRs), enquanto as regiões mais altamente conservadas no domínio variável são denominadas regiões de estrutura (FR). Sem querer estar ligado a qualquer mecanismo ou teoria particular, acredita-se que as CDR das cadeias leves e pesadas são principalmente responsáveis pela interação e especificidade do anticorpo com o antígeno. Em certas modalidades, a região variável é uma região variável humana. Em certas modalidades, a região variável compreende CDR de roedor ou murino e regiões de estrutura humana (FRs). Em modalidades particulares, a região variável é uma região variável de primata (por exemplo, primata não humano). Em certas modalidades, a região variável compreende CDRs de roedor ou de murino e regiões de estrutura de primata (por exemplo, primata não humano) (FRs).

[0105] Os termos “VL” e “domínio VL” são usados de forma intercambiável para fazer referência à região variável da cadeia leve de um anticorpo.

[0106] Os termos “VH” e “domínio VH” são usados de forma intercambiável para referir a região variável da cadeia pesada de um anticorpo.

[0107] Conforme usado no presente documento, os termos “região constante” e “domínio constante” são intercambiáveis e são comuns na técnica. A região constante é uma porção de anticorpo, por exemplo, uma porção do terminal carboxila de uma cadeia leve e/ou pesada que não está diretamente envolvida na ligação de um anticorpo ao antígeno, mas que pode exibir várias funções efectoras, como interação com um receptor Fc (por exemplo, receptor gama Fc). A região constante de uma molécula de imunoglobulina tem geralmente uma sequência de aminoácidos mais conservada em relação a um domínio variável de imunoglobulina.

[0108] Conforme usado no presente documento, o termo “cadeia pesada” quando utilizado em referência a um anticorpo pode referir-se a qualquer tipo distinto, por exemplo, alfa (α), delta (δ), epsilon (ϵ), gama (γ) e

mu (μ), com base na sequência de aminoácidos do domínio constante, que dá origem a classes de anticorpos IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, incluindo subclasses de IgG, por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

[0109] Conforme usado no presente documento, o termo “cadeia leve” quando utilizado em referência a um anticorpo pode referir-se a qualquer tipo distinto, por exemplo, kappa (κ) ou lambda (λ) com base na sequência de aminoácidos dos domínios constantes. As sequências de aminoácidos da cadeia leve são bem conhecidas na técnica.

[0110] Conforme usado no presente documento, o termo “sistema de numeração da UE” se refere à convenção de numeração da UE para as regiões constantes de um anticorpo, conforme descrito em Edelman, GM et al, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78 a 85 (1969) e Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 5a edição, 1991, cada um dos quais está incorporado ao presente documento a título referência em sua totalidade.

[0111] “Afinidade de ligação” geralmente se refere à força da soma total de interações não covalentes entre um único sítio de ligação de uma molécula (por exemplo, um anticorpo) e seu parceiro de ligação (por exemplo, um antígeno). Salvo indicação em contrário, conforme usado no presente documento, “afinidade de ligação” se refere a afinidade de ligação intrínseca que reflete uma interação de 1:1 entre membros de um par de ligação (por exemplo, anticorpo e antígeno). A afinidade de uma molécula X por seu parceiro Y geralmente pode ser representada pela constante de dissociação (KD). A afinidade pode ser medida e/ou expressa de várias maneiras conhecidas na técnica, incluindo, mas não se limitando a, constante de dissociação de equilíbrio (KD) e constante de associação de equilíbrio (KA). A KD é calculada a partir do quociente de koff/kon, enquanto que a KA é calculada a partir do quociente de kon/koff. Refere-se à constante de taxa de associação de, por exemplo, um anticorpo para um antígeno, e kon se refere à constante de taxa de dissociação de, por exemplo, um anticorpo para um

antígeno. O k_{on} e k_{off} podem ser determinados por técnicas conhecidas de um versado na técnica, como BIAcore® ou KinExA. Conforme usado no presente documento, uma “afinidade inferior” se refere a uma KD maior.

[0112] Conforme usado no presente documento, os termos “liga especificamente”, “reconhece especificamente”, “liga-se imunoespecificamente” e “reconhece imunoespecificamente” são termos análogos no contexto de anticorpos e se referem a moléculas que se ligam a um antígeno (por exemplo, epítipo) ou complexo imunitário como tal ligação é entendida por um versado na técnica. Por exemplo, uma molécula que se liga especificamente a um antígeno pode se ligar a outros peptídeos ou polipeptídeos, geralmente com menor afinidade, conforme determinado por, por exemplo, imunoensaios, BIAcore®, KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID), ou outros ensaios conhecidos na técnica. Em uma modalidade específica, moléculas que se ligam especificamente a um antígeno se ligam ao antígeno com um K_A que é pelo menos 2 logs (isto é, fatores de 10), 2,5 logs, 3 logs, 4 logs ou maior que o K_A quando as moléculas se ligam não especificamente para outro antígeno.

[0113] Em outra modalidade específica, as moléculas que se ligam especificamente a um antígeno não reagem de forma cruzada com outras proteínas sob condições de ligação semelhantes. Em outra modalidade específica, as moléculas que se ligam especificamente a CTLA-4 não reagem de forma cruzada com outras proteínas não CTLA-4. Em uma modalidade específica, é fornecido no presente documento um anticorpo que se liga a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) com afinidade superior a outro antígeno não relacionado. Em certas modalidades, é fornecido no presente documento um anticorpo que se liga a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) com 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60 %, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% ou mais de afinidade do que para outro antígeno não relacionado, medido, por exemplo, por radioimunoensaio, ressonância plasmônica de superfície ou ensaio de exclusão cinética. Em uma modalidade

específica, a extensão da ligação de um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento a uma proteína diferente de CTLA-4 não relacionada é inferior a 10%, 15% ou 20% da ligação do anticorpo a proteína CTLA-4 medida por, por exemplo, um radioimunoensaio.

[0114] Conforme usado no presente documento, o termo “afucosilação” ou “afucosilado” no contexto de um Fc se refere a uma falta substancial de uma fucose ligada, direta ou indiretamente, ao resíduo 297 da região IgG1 Fc humana, numerada de acordo com o sistema de numeração da UE ou o resíduo correspondente em imunoglobulinas não IgG1 e IgG1 não humanas. Assim, em uma composição que compreende uma pluralidade de anticorpos afucosilados, pelo menos 70% dos anticorpos não serão fucosilados, direta ou indiretamente (por exemplo, através de açúcares intervenientes) no resíduo 297 da região Fc dos anticorpos, e em algumas modalidades a menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% não serão fucosilados, direta ou indiretamente, no resíduo 297 da região Fc.

[0115] Conforme usado no presente documento, um “epítopo” é um termo na técnica e se refere a uma região localizada de um antígeno ao qual um anticorpo pode ligar-se especificamente. Um epítopo pode ser, por exemplo, aminoácidos contíguos de um polipeptídeo (epítopo linear ou contíguo) ou um epítopo pode, por exemplo, unir-se a partir de duas ou mais regiões não contíguas de um polipeptídeo ou polipeptídeos (conformacional, não linear, epítopo descontínuo ou não contíguo). Em certas modalidades, o epítopo ao qual um anticorpo se liga pode ser determinado por, por exemplo, espectroscopia de RMN, estudos de cristalografia de difração de raios X, ensaios de ELISA, troca hidrogênio/deutério acoplada a espectrometria de massa (por exemplo, espectrometria de massa de eletroaspersão por cromatografia líquida), ensaios de varredura de oligopeptídeos à base de arranjo (por exemplo, restringir peptídeos utilizando CLIPS (ligação química de peptídeos sobre estruturas de base) para mapear epítopos descontínuos ou conformacionais) e/ou mapeamento de mutagênese (por exemplo,

mapeamento de mutagênese dirigida). Para cristalografia de raios X, a cristalização pode ser conseguida utilizando qualquer um dos modos conhecidos na técnica (por exemplo, Giege R et al., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50 (Pt 4): 339 a 350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1 a 23, Chayen NE (1997) *Estrutura* 5: 1.269 a 1.274, McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6.300 a 6.303, todos os quais estão incorporado ao presente documentos a título de referência em sua totalidade). Cristais de anticorpo:antígeno podem ser estudados usando técnicas de difração de raios X bem conhecidas e podem ser refinados usando software de computador como X-PLOR (Yale University, 1992, distribuído por Molecular Simulations, Inc; consulte, por exemplo, *Meth Enzymol* (1985) volumes 114 e 115, eds Wyckoff HW et al., US 2004/0014194) e BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49 (Pt 1): 37 a 60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A:361 a 423, ed Carter CW, Roversi P et al, (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 10): 1.316 a 1.323), os quais estão incorporado ao presente documentos a título de referência em sua totalidade. Os estudos de mapeamento de mutagênese podem ser realizados utilizando qualquer método conhecido por um versado na técnica. Consulte, por exemplo, Champe M et al, (1995) *J Biol Chem* 270: 1.388 a 1.394 e Cunningham BC e Wells JA (1989) *Science* 244: 1.081 a 1.085, cada um dos quais está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade, para uma descrição de técnicas de mutagênese, incluindo técnicas de mutagênese por varredura de alanina. O CLIPS (Ligação Química de Peptídeos a Scaffolds) é uma tecnologia para apresentar um ou mais peptídeos em uma configuração restrita estruturalmente para se comportar como mimetizadores funcionais de domínios complexos de proteínas. Consulte, por exemplo, as Publicações nº US 2008/0139407 A1 e US 2007/099240 A1, e Patente nº US 7.972.993, cada uma das quais está incorporada ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Em uma modalidade específica, o epítipo de um anticorpo é determinado utilizando estudos de

mutagênese por varredura de alanina. Em uma modalidade específica, o epítopo de um anticorpo é determinado utilizando troca de hidrogênio/deutério acoplada a espectrometria de massa. Em uma modalidade específica, o epítopo de um anticorpo é determinado utilizando a Tecnologia de Mapeamento de Epítopos CLIPS da Pepscan Therapeutics.

[0116] Conforme usado no presente documento, o termo “um epítopo localizado dentro de uma região de CTLA-4 humano” que consiste em uma sequência particular de aminoácidos ou um conjunto de resíduos de aminoácidos se refere a um epítopo que compreende um ou mais dos resíduos de aminoácidos de a região especificada, em que a região especificada inclui o primeiro resíduo de aminoácido especificado e o último resíduo de aminoácido especificado da região de CTLA-4 humano. Em certas modalidades, o epítopo compreende cada um dos resíduos de aminoácidos localizados dentro da região especificada. Em certas modalidades, um ou mais resíduos de aminoácidos adicionais de CTLA-4 humano fora da região especificada ligam-se a um anticorpo em conjunto com um epítopo localizado dentro da região especificada.

[0117] Conforme usado no presente documento, os termos “receptor de células T” e “TCR” são usados de forma intercambiável e se referem a TCRs heterodiméricos $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ completos, fragmentos de ligação ao antígeno de TCRs completos e moléculas que compreende CDRs de TCR ou regiões variáveis. Exemplos de TCRs incluem, mas não estão limitados a, TCRs completos, fragmentos de ligação ao antígeno de TCRs completos, TCRs solúveis sem regiões transmembrana e citoplasmáticas, TCRs de cadeia única contendo regiões variáveis de TCRs ligados por um ligante flexível, cadeias de TCR ligadas por uma ligação dissulfureto de engenharia, TCRs monoespecíficos, TCRs multiespecíficos (incluindo TCRs biespecíficos), fusões de TCR, TCRs humanos, TCRs humanizados, TCRs quiméricos, TCRs produzidos de forma recombinante e TCRs sintéticos. O termo abrange TCRs de tipo selvagem e TCRs geneticamente modificados (por exemplo, um TCR

quimérico que compreende uma cadeia de TCR quimérico que inclui uma primeira porção de um TCR de uma primeira espécie e uma segunda porção de um TCR de uma segunda espécie).

[0118] Conforme usado no presente documento, os termos “complexo de histocompatibilidade principal” e “MHC” são usados de forma intercambiável e se referem a uma molécula de MHC de classe I e/ou a uma molécula de MHC de classe II.

[0119] Conforme usado no presente documento, o termo “complexo peptídeo-MHC” se refere a uma molécula de MHC (MHC de classe I ou MHC de classe II) com um peptídeo ligado à bolsa de ligação ao peptídeo do MHC, reconhecido na técnica.

[0120] Conforme usado no presente documento, o termo “tratar”, “que trata” e “tratamento” se refere a medidas terapêuticas ou preventivas descrita no presente documentos. Os métodos de “tratamento” empregam a administração de um anticorpo a um indivíduo que tem uma doença ou distúrbio, ou predisposto a ter uma tal doença ou distúrbio, de modo a prevenir, curar, atrasar, reduzir a gravidade ou melhorar um ou mais sintomas da doença ou distúrbio ou doença ou distúrbio recorrentes, ou de modo a prolongar a sobrevivência de um indivíduo além daquela esperada na ausência de tal tratamento.

[0121] Conforme usado no presente documento, o termo “quantidade eficaz” no contexto da administração de uma terapia a um indivíduo se refere à quantidade de uma terapia que atinge um efeito profilático ou terapêutico desejado.

[0122] Conforme usado no presente documento em relação à resposta de um câncer a uma terapia, os termos “refratário” e “resistente” têm o seu significado reconhecido na técnica e são usados de forma intercambiável.

[0123] Conforme usado no presente documento, o termo “indivíduo” inclui qualquer animal humano ou não humano. Em uma

modalidade, o indivíduo é um mamífero humano ou não humano. Em uma modalidade, o indivíduo é um humano.

[0124] A determinação da “porcentagem de identidade” entre duas sequências (por exemplo, sequências de aminoácidos ou sequências de ácidos nucleicos) pode ser realizada utilizando um algoritmo matemático. Um exemplo específico e não limitativo de um algoritmo matemático utilizado para a comparação de duas sequências é o algoritmo de Karlin S & Altschul SF (1990) PNAS 87: 2.264 a 2.268, modificado como em Karlin S & Altschul SF (1993) PNAS 90 : 5.873 a 5.877, cada um dos quais está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Tal algoritmo é incorporado nos programas NBLAST e XBLAST de Altschul SF et al. (1990) J Mol Biol 215: 403, que está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Pesquisas de nucleotídeos BLAST podem ser realizadas com o conjunto de parâmetros do programa de nucleotídeos NBLAST, por exemplo, para pontuação = 100, comprimento de palavra = 12 para obter sequências nucleotídicas homólogas a uma molécula de ácido nucleico descrita no presente documento. As pesquisas de proteínas BLAST podem ser realizadas com o conjunto de parâmetros do programa XBLAST, por exemplo, para marcar 50, comprimento de palavra = 3 para obter sequências de aminoácidos homólogas a uma molécula de proteína descrita no presente documento. Para obter alinhamentos com intervalos para fins de comparação, pode ser utilizado Gapped BLAST conforme descrito em Altschul SF et al, (1997) Nuc Acids Res 25: 3.389 a 3.402, que incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Alternativamente, o PSI BLAST pode ser usado para realizar uma pesquisa iterada que detecta relações distantes entre moléculas (Id.). Ao utilizar programas BLAST, Gapped BLAST e PSI Blast, os parâmetros padrão dos respectivos programas (por exemplo, de XBLAST e NBLAST) podem ser usados (consulte, por exemplo, National Center for Biotechnology Information (NCBI) na rede mundial de computadores, ncbi). nlm.nih.gov). Outro exemplo específico, não limitativo, de

um algoritmo matemático utilizado para a comparação de sequências é o algoritmo de Myers e Miller, 1988, CABIOS 4: 11 a 17, que está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Esse algoritmo é incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), que faz parte do pacote de software de alinhamento de sequências GCG. Ao utilizar o programa ALIGN para comparar sequências de aminoácidos, uma tabela de resíduos de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de gap de 12, e uma penalidade de gap de 4 podem ser usados.

[0125] A porcentagem de identidade entre duas sequências pode ser determinada utilizando técnicas semelhantes às descritas acima, com ou sem permissão de lacunas. No cálculo da porcentagem de identidade, geralmente apenas as correspondências exatas são contadas.

6.2 ANTICORPOS ANTI-CTLA-4

[0126] Em um aspecto, a presente revelação fornece anticorpos que se ligam especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e antagonizam a função de CTLA-4. As sequências de aminoácidos de anticorpos exemplificativos são apresentadas nas Tabelas 1-4 apresentadas no presente documento.

Tabela 1. Sequências de aminoácidos de anticorpos anti-CTLA-4 exemplificativos.

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência de aminoácidos
1	AGEN1884 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWSSISSSSYIYYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGL MGPFDIWGQGTMTVSS
2	AGEN1884_M102F VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWSSISSSSYIYYADSVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTMTVSS

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência de aminoácidos
3	AGEN1884_M113L VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRF TISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGL MGPFDIWGQGTLTVSS
4	AGEN1884_D62E VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAESVKGRF TISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGL MGPFDIWGQGTMTVTVSS
5	AGEN1884_M102F_M102 F VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRF TISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTLTVTVSS
6	AGEN1884_D62E_M102 F VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAESVKGRF TISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTMTVTVSS
7	AGEN1884_D62E M113 L VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAESVKGRF TISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGL MGPFDIWGQGTLTVTVSS
8	AGEN1884_D62E_M102F_M113L VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAESVKGRF TISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTLTVTVSS
9	AGEN1884 VL	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSRYLGW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTD FTLTITRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTVKVE IK
10	CDRH1	YSYMN
11	CDRH2	SISSSSSYIYYADSVKG
12	CDRH2	SISSSSSYIYYAESVKG

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência de aminoácidos
13	CDRH3	VGLMGPFDI
14	CDRH3	VGLFGPFDI
15	CDRL1	RASQSVSRYL
16	CDRL2	GASTRAT
17	CDRL3	QQYGSSPWT
18	CDRH2 consensus sequence	SISSSSSYIYAXSVKG, em que: X é E ou D
19	CDRH3 consensus sequence	VGLXGPFDI, em que: X é F ou M
20	VH consensus sequence	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWRQAPGKGLEWSSISSSSSYIYAXISVKGRF TISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGL X2GPFDIWGQGTGX3VTVSS, em que: X1 é E ou D, X2 é F ou M, e X3 é L ou M.
23	AGEN1884.H3 (IgG1) cadeia pesada	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWRQAPGKGLEWSSISSSSSYIYAESVKGRF TISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTSLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
24	AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/1332E) cadeia	EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWRQAPGKGLEWSSISSSSSYIYAESVKGRF

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência de aminoácidos
	pesada	TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVWTVPSSSLGTQTYICNVNHNK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPD VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPEEKTI SKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
25	AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/1332E) cadeia pesada	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWRQAPGKGLEWSSISSSSSYIYYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVWTVPSSSLGTQTYICNVNHNK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPD VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPLPEEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
26	AGEN1884.H3 (IgG1 L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L) cadeia pesada	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWRQAPGKGLEWSSISSSSSYIYYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVWTVPSSSLGTQTYICNVNHNK

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência de aminoácidos
		PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELVGGPS VFLLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTLRVVSFLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG
47	AGEN1884.H3 (IgG1 N297A) cadeia pesada	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWRQAPGKGLEWSSISSSSSSYIYYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSFLT LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS PG
48	AGEN1884.H3 (IgG1 S267E/L328F) cadeia pesada	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWRQAPGKGLEWSSISSSSSSYIYYAESVKGRF TISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLF GPFDIWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSFLT LHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPAIEKTISKAKGQ

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência de aminoácidos
		PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS PG
27	AGEN1884.H3 cadeia leve	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSRYLGW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTD FTLTITRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGEC
28	IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
29	IgG1 S239D/I332E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
30	IgG1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência de aminoácidos
	S239D/A330L/1332E	PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
31	IgG1 L235V/F243L/R292P/Y3 00L/P396L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPPEEQYNSTLRVVS LTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPLVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
32	Região constante de cadeia leve	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

[0127] * CDRs são definidos de acordo com o sistema de numeração Kabat.

Tabela 2. Heavy Sequências de aminoácidos de CDR de cadeia pesada de anticorpos anti-CTLA-4 exemplificadores.*

VH (SEQ ID NO:)	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)

VH (SEQ ID NO:)	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
AGEN1884 VH (1)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSVKG (11)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_M102F VH (2)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSVKG (11)	VGLFGPFDI (14)
AGEN1884_M113L VH (3)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSVKG (11)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_D62E VH (4)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESVKG (12)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_M102F_M113L VH (5)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSVKG (11)	VGLFGPFDI (14)
AGEN1884_D62E_M102F VH (6)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESVKG (12)	VGLFGPFDI (14)
AGEN1884_D62E_M113L VH (7)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESVKG (12)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_D62E_M102F M113L VH (8)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESVKG (12)	VGLFGPFDI (14)

[0128] *Definido de acordo com o sistema de numeração

Kabat

Tabela 3. Sequências de aminoácidos de CDR de cadeia leve de anticorpos anti-CTLA-4 exemplificativos.

VL (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
AGEN1884 VL (9)	RASQSVSRYLG (15)	GASTRAT (16)	QQYGSSPWT (17)

[0129] *Definido de acordo com o sistema de numeração

de Kabat.

Tabela 4. Anticorpos anti-CTLA-4 exemplificadores.

Anticorpo	Região variável de cadeia pesada	SEQ ID NO:	Região variável de cadeia leve	SEQ ID NO:
AGEN1884	AGEN1884 VH	1	AGEN1884 VL	9

Anticorpo	Região variável de cadeia pesada	SEQ ID NO:	Região variável de cadeia leve	SEQ ID NO:
AGEN1884.H1.1	AGEN1884_M102F VH	2	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H1.2	AGEN1884_M113L VH	3	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H1.3	AGEN1884_D62E VH	4	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H2.1	AGEN1884_M102F_M113L VH	5	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H2.2	AGEN1884_D62E_M102F VH	6	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H2.3	AGEN1884_D62E_M113L VH	7	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H3	AGEN1884_D62E_M102F_M113L VH	8	AGEN1884 VL	9

Tabela 5. Genes de linha germinativa mais próxima.

SEQ ID NO:	Gene de linha germinativa mais próxima	Sequência de aminoácido
21	IGHV3-21*01	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVK GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA R
22	IGKV3-20*01	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP

Tabela 6. Sequências exemplificadoras de CTLA-4 e membros da família.

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência de aminoácidos
33	Proteína imatura de CTLA-4 humano (P16410)	MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFC KAMHVAQPAVVLASSRGIA SFVCEYASPGKATEV RVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência de aminoácidos
		CTGTS SGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYP PPYYLGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILAAVSS GLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPP TEPECEKQFQPYFIPIN
34	epítoto de CTLA-4	YLG I
35	epítoto de CTLA-4	YPPPY YLG I
36	epítoto de CTLA-4	YLGIGNGTQ I
37	epítoto de CTLA-4	YPPPY YLGIGNGTQ I
38	epítoto de CTLA-4	MYPPPY Y
39	epítoto de CTLA-4	QVT
40	MACFA CTLA-4 (G7PL88)	MACLG FQRH KARLNLATRTRPYTLLFSLFIPVFS KAMHVAQPAVVLANSRGIA SFVCEYASPGKATE VRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDS ICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMY PPPY YMGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILAAVS SGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMP PTEPECEKQFQPYFIPIN
41	CTLA-4 de Camundongo (P09793)	MACLGLRRYKAQLQLPSRTWPFVALLTLLFIPVFS EAIQVTQPSVVLASSHGVA SFPC EYSPSHNTDEV R VTVLRQTNDQMTEVCATTFTEKNTVGFLDYPFCS GTFNESRVNLTIQGLRAVD TGLYLCKVELMYPPP YFVG MGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILVAVSLG LFFYSFLVSAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPPT EPECEKQFQPYFIPIN
42	CTLA-4 de camundongo (Q62859)	MACLGLQRYKTHLQLPSRTWPFVLLSLLFIPIFSE AIQVTQPSVVLASSHGVA SFPC EYASSHNTDEV R VTVLRQTNDQVTEVCATTFVKN TLGFLDDPFCS GTFNESRVNLTIQGLRAAD TGLYFCKVELMYPPP YFVG MGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILAAVSSG

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência de aminoácidos
		LFFYSFLVTAVSLNRTLKKRSPLTTGVYVKMPPTPE PECEKQFQPYFIPIN
43	CD28 humano (P10747)	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDN AVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVV YGNYSQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQN LYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVK GKHLCPSPLFPGPSKPFWWLVVGGVLACYSLLV TVAFIIFWWSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRK HYQPYAPPRDFAAYRS
44	ICOS humano (Q9Y6W8)	MKSGLWYFFLFCRLRIKVLGTGEINGSANYEMFIFHN GGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGGQILCDLTKTK GSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLDHSHA NYYFCNLSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQL KFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVH DPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL
45	BTLA humano (Q7Z6A9)	MKTLPAMLGTGKLFWWFFLIPYLDIWNHKGESC DVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHV TWCKLNGTTCVKLEDQRQTSWKEEKNISFFILHFEP VLPNDNGSYRCSANFQSNLIESHSTTLYVTDVKSA SERPSKDEMASRPWLLYRLLPLGGLPLLITTCFCL FCCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQT EASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEV YSNPCLEENKPGIVYASLNHSGVGPNSRLARNVKE APTEYASICVRS
46	PD-1 humano (Q15116)	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPW NPPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNLW YRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLP NGRDFHMSVVRARRNDSTYLCGAISLAPKAQIK ESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLV VGVVGGLLGSLVLLVWLAVICSRAARGTIGARR TGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPP

SEQ ID NO:	Descrição	Sequência de aminoácidos
		VPCVPEQTEYATIVFPSGMTSSPARRGSADGPRS AQPLRPEDGHCSWPL

[0130] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende o anticorpo um domínio VH que compreende uma, duas ou todas as três CDRs de um VH. domínio estabelecido na Tabela 1 no presente documento. Em certas modalidades, o anticorpo compreende a CDRH1 de um dos domínios VH apresentados na Tabela 1. Em certas modalidades, o anticorpo compreende a CDRH2 de um dos domínios VH apresentados na Tabela 1. Em certas modalidades, o anticorpo compreende a CDRH3 de um dos domínios VH apresentados na Tabela 1.

[0131] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende o anticorpo um domínio VL que compreende uma, duas ou todas as três CDRs de uma LV domínio divulgado na Tabela 1 no presente documento. Em certas modalidades, o anticorpo compreende a CDRL1 de um dos domínios VL apresentados na Tabela 1. Em certas modalidades, o anticorpo compreende a CDRL2 de um dos domínios VL apresentados na Tabela 1. Em certas modalidades, o anticorpo compreende a CDRL3 de um dos domínios VL apresentados na Tabela 1.

[0132] Em certas modalidades, as CDRs de um anticorpo podem ser determinadas de acordo com Kabat et al, J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) e Kabat et al., Sequences of protein of immunological interest (1991), cada uma das quais está incorporada ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0133] Em certas modalidades, as CDRs de um anticorpo podem ser determinadas de acordo com o esquema de numeração

de Chothia, que se refere à localização das alças estruturais da imunoglobulina (consulte, por exemplo, Chothia C & Lesk AM, 1987), J Mol Biol 196. : 901 a 917; Al-Lazikani B et al, (1997) J Mol Biol 273: 927 a 948; Chothia C et al, (1992) J Mol Biol 227: 799 a 817; Tramontano A et al., (1990).) J Mol Biol 215 (1): 175 a 182, e a Patente nº US 7.709.226, todos os quais estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade). Tipicamente, quando se utiliza a convenção de numeração de Kabat, a alça de CDRH1 de Chothia está presente nos aminoácidos de cadeia pesada 26 a 32, 33 ou 34, a alça de CDRH2 de Chothia está presente nos aminoácidos de cadeia pesada 52 a 56, e a alça Chothia CDRH3 é presente nos aminoácidos de cadeia pesada 95 a 102, enquanto a alça de CDRL1 de Chothia está presente nos aminoácidos de cadeia leve 24 a 34, a alça de CDRL2 de Chothia está presente nos aminoácidos de cadeia leve 50 a 56, e a alça de CDRL3 de Chothia está presente à luz aminoácidos de cadeia 89 a 97. O final da alça de CDRH1 de Chothia quando numerado usando a convenção de numeração de Kabat varia entre H32 e H34 dependendo do comprimento da alça (isso ocorre porque o esquema de numeração de Kabat coloca as inserções em H35A e H35B; se nem 35A nem 35B estiverem presentes, a alça termina em 32, se apenas 35A estiver presente, a alça termina em 33, se ambos 35A e 35B estiverem presentes, a alça terminará em 34).

[0134] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), o anticorpo que compreende as CDRs de VH de Chothia de um VH divulgado na Tabela 1 no presente documento. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende o anticorpo as CDRs de VL de Chothia de uma VL divulgada na Tabela 1 no presente documento apresentada. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende o anticorpo CDRs de VH de

Chothia e CDR de VL de Chothia de um anticorpo divulgado na Tabela 1. Em certas modalidades, os anticorpos que se ligam especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) compreendem uma ou mais CDRs, nas quais as CDRs de Chothia e Kabat têm a mesma sequência de aminoácidos. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e compreende combinações de CDRs de Kabat e CDRs de Chothia.

[0135] Em certas modalidades, as CDRs de um anticorpo podem ser determinadas de acordo com o sistema de numeração IMGT conforme descrito em Lefranc MP, (1999) *The Immunologist* 7: 132 a 136 e Lefranc MP et al, (1999) *Nucleic Acids Res* 27 : 209 a 212, cada um dos quais está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0136] Em certas modalidades, a presente revelação fornece anticorpos que se ligam especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e compreendem CDRs de um anticorpo divulgado na Tabela 1, conforme determinado pelo sistema de numeração IMGT, por exemplo, conforme descrito em Lefranc MP (1999) *supra* e Lefranc MP et al. (1999) *supra*.

[0137] Em certas modalidades, as CDRs de um anticorpo podem ser determinadas de acordo com o esquema de numeração AbM, que se refere às regiões hipervariáveis de AbM, que representam um compromisso entre as alças estruturais de CDR de Chothia e Kabat e são usadas pelo anticorpo AbM da Oxford Molecular. software de modelagem (Oxford Molecular Group, Inc.), incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Em uma modalidade particular, a presente revelação fornece anticorpos que se ligam especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e compreende CDR de um anticorpo divulgado na Tabela 1 no presente documento, conforme determinado pelo esquema de numeração AbM.

[0138] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), em que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende os aminoácidos da região CDRH1, CDRH2 e CDRH3. sequências de um domínio VH apresentadas na SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 7 ou 8 e uma região variável da cadeia leve que compreende as sequências de aminoácidos da região CDRL1, CDRL2 e CDRL3 de um domínio VL na SEQ ID NO: 9, em que cada CDR é definido de acordo com a definição de MacCallum, a definição de Kabat, a definição de Chothia, a combinação da definição de Kabat e da definição de Chothia, o sistema de numeração IMGT ou a definição de CDR do AbM.

[0139] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende o anticorpo:

- (a) uma CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de SYSMN (SEQ ID NO: 10); e/ou
- (b) uma CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SSSSSSYIYYAXSVKG (SEQ ID NO: 18), em que X é E ou D; e/ou
- (c) uma CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de VGLXGPFDI (SEQ ID NO: 19), em que X é F ou M; e/ou
- (d) CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de RASQSVSRYLG (SEQ ID NO: 15); e/ou
- (e) CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de GASTRAT (SEQ ID NO: 16); e/ou
- (f) CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 17), e em que as sequências CDRH1, CDRH2 e CDRH3 do anticorpo não são SEQ ID NO: 10, 11 e 13, respectivamente.

[0140] Em certas modalidades, CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 11. Em certas modalidades, CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 12. Em certas

modalidades, CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 13. Em certas modalidades, CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 14.

[0141] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), em que o anticorpo compreende um domínio VH que compreende as sequências de aminoácidos CDRH1, CDRH2 e CDRH3 adiante nas SEQ ID NO: 10, 11 e 14; 10, 12 e 13; ou 10, 12 e 14, respectivamente. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), em que o anticorpo compreende um domínio VH que compreende as sequências de aminoácidos CDRH1, CDRH2 e CDRH3 apresentadas em SEQ ID NO: 10, 12 e 14, respectivamente.

[0142] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), em que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende regiões CDRH1, CDRH2 e CDRH3, e uma região variável de cadeia leve que compreende regiões CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que as regiões CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NO: 10, 11, 16 e 17; 10, 12, 13, 15, 16 e 17; ou 10, 12, 14, 15, 16 e 17, respectivamente. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), em que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende regiões CDRH1, CDRH2 e CDRH3 e uma cadeia variável região que compreende as regiões CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que as regiões CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NO: 10, 12, 14, 15, 16, e 17, respectivamente.

[0143] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 20. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% (por exemplo, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 7 ou 8. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% (por exemplo, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntico ao sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 3. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 7 ou 8. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 3. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 4. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 5. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 6. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada

que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 7. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 8.

[0144] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% (por exemplo, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 9. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável de cadeia leve que tem a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 9.

[0145] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 20, e um região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% (por exemplo, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntico ao sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 7 ou 8, e uma região variável da cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% (por exemplo, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntico ao conjunto de sequências de aminoácidos adiante na SEQ ID NO: 9. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que

compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% (por exemplo, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntico ao sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 3 e uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou 100% (por exemplo, pelo menos 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ou 99%) idêntica à sequência de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 9. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve que tem as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 2 e 9; 4 e 9; 5 e 9; 6 e 9; 7 e 9; ou 8 e 9, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e região variável da cadeia leve que tem as sequências de aminoácidos apresentadas na SEQ ID NO: 2 e 9, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve que tem as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 3 e 9, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve que tem as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 4 e 9, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve que tem as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 5 e 9, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve que tem as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 6 e 9, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve que tem as sequências de aminoácidos estabelecidas na SEQ ID NO: 7 e 9, respectivamente. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região

variável da cadeia pesada e uma região variável da cadeia leve com as sequências de aminoácidos apresentadas nas SEQ ID NO: 8 e 9, respectivamente.

[0146] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma região variável de cadeia pesada com uma sequência de aminoácidos derivada de uma sequência germinativa IGHV3-21 humana (por exemplo, IGHV3-21*01, por exemplo, que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21). Uma ou mais regiões selecionadas da estrutura 1, estrutura 2, estrutura 3, CDRH1 e CDRH2 (por exemplo, duas, três, quatro ou cinco dessas regiões) podem ser derivadas de uma sequência de linha germinativa IGHV3-21 humana (por exemplo, IGHV3-21*01, por exemplo, que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21). Em uma modalidade, a estrutura 1, estrutura 2, estrutura 3, CDRH1 e CDRH2 são todas derivadas de uma sequência de linha germinativa IGHV3-21 humana (por exemplo, IGHV3-21*01, por exemplo, que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21).

[0147] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma região variável de cadeia leve com uma sequência de aminoácidos derivada de uma sequência de linha germinativa humana selecionada do grupo que consiste em IGKV3-20 (por exemplo, IGKV3-20*01, por exemplo, que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22). Uma ou mais regiões selecionadas da estrutura 1, estrutura 2, estrutura 3, CDRL1 e CDRL2 (por exemplo, duas, três, quatro ou cinco destas regiões) podem ser derivadas de uma sequência da linha germinativa humana selecionada do grupo que consiste em IGKV3-20. (por exemplo, IGKV3-20*01, por exemplo, que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22). Em uma modalidade, a estrutura 1, estrutura 2, estrutura 3, CDRL1 e CDRL2 são todas derivadas de uma sequência de linha germinativa humana selecionada

do grupo que consiste em IGKV3-20 (por exemplo, IGKV3-20*01, por exemplo, que tem a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 22).

[0148] [Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma região variável de cadeia pesada com uma sequência de aminoácidos derivada de uma sequência germinativa IGHV3-21 humana (por exemplo, IGHV3-21*01, p. ex., que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 21), e uma região variável de cadeia leve com uma sequência de aminoácidos derivada de uma sequência da linha germinativa humana selecionada do grupo que consiste em IGKV3-20 (por exemplo, IGKV3-20*01, por exemplo, que tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 22).

[0149] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que compete de forma cruzada para ligação ao CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) com um anticorpo que compreende as sequências de aminoácidos da região variável de cadeia pesada e leve estabelecidas em SEQ ID NOS: 2 e 9; 4 e 9; 5 e 9; 6 e 9; 7 e 9; ou 8 e 9, respectivamente. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que atravessa a ligação a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) com um anticorpo que compreende as sequências de aminoácidos da região variável da cadeia pesada e leve apresentadas nas SEQ ID NO: 3 e 9, respectivamente.

[0150] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga ao mesmo ou a um epítipo sobreposto de CTLA-4 (por exemplo, um epítipo de CTLA-4 humano) como um anticorpo descrito no presente, por exemplo, um anticorpo que compreende o sequências de aminoácidos da região variável da cadeia pesada e leve estabelecidas nas SEQ ID NO: 2 e 9; 4 e 9; 5 e 9; 6 e 9; 7 e 9; ou 8 e 9, respectivamente. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga ao mesmo ou a um epítipo sobreposto de CTLA-

4 (por exemplo, um epítopo de CTLA-4 humano) como um anticorpo descrito no presente documento, por exemplo, um anticorpo que compreende o pesado e leve sequências de aminoácidos da região variável de cadeia estabelecidas nas SEQ ID NO: 3 e 9, respectivamente. Em certas modalidades, o epítopo de um anticorpo pode ser determinado por, por exemplo, espectroscopia de RMN, ressonância plasmônica de superfície (BIAcore®), estudos de cristalografia de difração de raios X, ensaios de ELISA, troca de hidrogênio/deutério acoplada com espectrometria de massa espectrometria de massa de eletroaspersão por cromatografia líquida), ensaios de varredura de oligopeptídeo à base de arranjo e/ou mapeamento de mutagênese (por exemplo, mapeamento de mutagênese sítio-dirigida). Para cristalografia de raios X, a cristalização pode ser conseguida utilizando qualquer um dos métodos conhecidos na técnica (por exemplo, Giege R et al., (1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50 (Pt 4): 339 a 350; McPherson A (1990) *Eur J Biochem* 189: 1 a 23, Chayen NE (1997) *Structure* 5: 1.269 a 1.274, McPherson A (1976) *J Biol Chem* 251: 6.300 a 6.303, todos os quais estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade). Cristais de anticorpo:antígeno podem ser estudados usando técnicas de difração de raios X bem conhecidas e podem ser refinados usando software de computador como X-PLOR (Yale University, 1992, distribuído por Molecular Simulations, Inc ; consulte, por exemplo, *Meth Enzymol* (1985) volumes 114 e 115, eds Wyckoff HW et al; Pedido de Patente US 2004/0014194) e BUSTER (Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49 (Pt 1): 37 a 60; Bricogne G (1997) *Meth Enzymol* 276A: 361 a 423, ed Carter CW, Roversi P et al, (2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 10): 1.316 a 1.323, todos os quais estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade). Os estudos de mapeamento de mutagênese podem ser realizados com o uso de qualquer método conhecido por um versado na técnica. Consulte, por exemplo, Champe M et al, (1995) *supra* e Cunningham BC e Wells JA (1989) *supra* para uma revelação de técnicas de mutagênese, incluindo técnicas de mutagênese por

varredura de alanina. Em uma modalidade específica, o epítopo de um anticorpo é determinado utilizando estudos de mutagênese por varredura de alanina. Adicionalmente, os anticorpos que reconhecem e se ligam aos mesmos ou sobrepostos epítomos de CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) podem ser identificados utilizando técnicas de rotina como um imunoensaio, por exemplo, mostrando a capacidade de um anticorpo bloquear a ligação de outro anticorpo a um antígeno-alvo, e um ensaio de ligação competitiva. Os ensaios de ligação de competição também podem ser usados para determinar se dois anticorpos têm especificidade de ligação semelhante para um epítopo. A ligação competitiva pode ser determinada em um ensaio em que a imunoglobulina a testar inibe a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum, como CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano). São conhecidos numerosos tipos de ensaios de ligação competitiva, por exemplo: radioimunoensaio direto (RIA) direto ou indireto em fase sólida, imunoensaio enzimático (EIA) direto ou indireto em fase sólida, ensaio de competição em sanduíche (consulte Stahl C et al, (1983) *Methods Enzymol* 9: 242 a 253); EIA de biotina-avidina direta de fase sólida (consulte Kirkland TN et al., (1986) *J Immunol* 137: 3614-9); ensaio marcado direto de fase sólida, ensaio em sanduíche marcado direto de fase sólida (consulte Harlow E & Lane D, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); RIA de marcador direto de fase sólida utilizando o marcador 1-125 (consulte Morel GA et al, (1988) *Mol Immunol* 25 (1): 7 a 15); EIA de biotina-avidina direta de fase sólida (consulte Cheung RC et al., *Virology* 176: 546 a 552, 1990); e RIA marcado direto (consulte Moldenhauer G et al, (1990) *Scand J Immunol* 32: 77 a 82), todos os quais estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Tipicamente, tal ensaio envolve a utilização de antígeno purificado (por exemplo, CTLA-4 como CTLA-4 humano) ligado a uma superfície sólida ou células contendo qualquer uma das mesmas, uma imunoglobulina de teste não marcada e uma imunoglobulina de referência marcada. A inibição competitiva pode ser medida determinando a quantidade

de marcador ligado à superfície sólida ou células na presença da imunoglobulina de teste. Normalmente, a imunoglobulina teste está presente em excesso. Normalmente, quando um anticorpo competidor está presente em excesso, o mesmo inibirá a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum em pelo menos 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75 % ou mais. Um ensaio de ligação de competição pode ser configurado em um grande número de diferentes formatos utilizando antígeno marcado ou anticorpo marcado. Em uma versão comum desse ensaio, o antígeno é imobilizado em uma placa de 96 poços. A capacidade de anticorpos não marcados bloquear a ligação de anticorpos marcados ao antígeno é, então, medida usando marcadores radioativos ou enzimáticos. Para mais detalhes consulte, por exemplo, Wagener C et al, (1983) J Immunol 130: 2;308 a 2.315; Wagener C et al, (1984) J Immunol Methods 68: 269 a 274; Kuroki M et al, (1990) Cancer Res 50: 4.872 a 4.879; Kuroki M et al, (1992) Immunol Invest 21: 523 a 538; Kuroki M et al, (1992) Hybridoma 11: 391 a 407 e Antibodies: A Laboratory Manual, editores Ed Harlow E & Lane D supra, páginas 386 a 389, todos os quais estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0151] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende o anticorpo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 23, 24, 25 ou 26. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 23. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 24. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 25. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 26.

[0152] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos estabelecidos na SEQ ID NO: 27.

[0153] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende o anticorpo uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 23 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 24 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27.

[0154] Qualquer região constante de Ig pode ser usado nos anticorpos descritos no presente documento. Em certas modalidades, a região Ig é uma molécula de imunoglobulina humana IgG, IgE, IgM, IgD, IgA ou IgY, qualquer classe (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), ou qualquer subclasse (por exemplo, IgG2a e IgG2b) da molécula de imunoglobulina.

[0155] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende o anticorpo uma região constante da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 28, 29, 30 ou 31. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende uma região constante da cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 32.

[0156] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende o anticorpo uma região constante de cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou fragmento desta uma mutação selecionada do grupo que consiste em: S239D, I332E e uma combinação das mesmas, numerada de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada de IgG1 que compreende mutações S239D e I332E, numeradas de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 29.

[0157] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende o anticorpo uma região constante de cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou fragmento da mesma uma mutação selecionada do grupo que consiste em: S239D, A330L, I332E e combinações dos mesmos, numeradas de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada de IgG1 que compreende mutações S239D, A330L e I332E, numeradas de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma

região constante da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 30.

[0158] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), que compreende o anticorpo uma região constante de cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou um fragmento da mesma que compreende uma mutação selecionada do grupo que consiste em: L235V, F243L, R292P, Y300L, P396L, e combinações dos mesmos, numeradas de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada de IgG1 que compreende mutações L235V, F243L, R292P, Y300L e P396L, numeradas de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 31.

[0159] Em certas modalidades, as regiões IgG dos anticorpos descritos no presente documento têm uma maior afinidade para FcγRIIIA, por exemplo, em comparação com um anticorpo com uma região Fc de tipo selvagem, por exemplo, um IgG1 Fc. As alterações de sequência que resultam em afinidade aumentada para FcγRIIIA são conhecidas na técnica, por exemplo, em Kellner et al, *Methods* 65: 105 a 113 (2014), Lazar et al, *Proc Natl Acad Sci* 103: 4.005 a 4.010 (2006), Shields et al, *J Biol Chem.* 276 (9): 6.591 a 6.604 (2001), cada um dos quais está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou um fragmento do mesmo que compreende uma mutação selecionada do grupo que consiste em: G236A, S239D, F243L, T256A, K290A, R292P, S298A, Y300L, V305I, A330L, I332E, E333A, K334A, A339T e P396L, e combinações dos mesmos, numeradas de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de cadeia pesada, por exemplo, uma região

constante de IgG1, ou um fragmento do mesmo que compreende S239D, numerado de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou um fragmento do mesmo que compreende T256A, numerado de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou um fragmento desta que compreende K290A, numerado de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou um fragmento do mesmo que compreende S298A, numerada de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou um fragmento do mesmo que compreende I332E, numerado de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou um fragmento desta que compreende E333A, numerado de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou um fragmento do mesmo que compreende K334A, numerado de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou um fragmento desta que compreende A339T, numerado de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou um fragmento do mesmo que compreende S239D e I332E, numerados de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou um fragmento do mesmo que

compreende S239D, A330L e I332E, numerados de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante da cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou um fragmento do mesmo que compreende S298A, E333A e K334A, numerados de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou um fragmento do mesmo que compreende G236A, S239D e I332E, numerados de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região constante de cadeia pesada, por exemplo, uma região constante de IgG1, ou fragmento desta que compreende F243L, R292P, Y300L, V305I e P396L, numerados de acordo com o sistema de numeração da UE.

Em certas modalidades, os anticorpos descritos no presente documento exibem atividade de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC). Em certas modalidades, os anticorpos descritos no presente documento iniciam a depleção celular mediada por células assassinas naturais. Em certas modalidades, os anticorpos descritos no presente documento são usados para o tratamento de tumores infiltrados com células assassinas naturais. Em certas modalidades, os anticorpos descritos no presente documento exibem atividade de fagocitose celular dependente de anticorpo (ADCP). Em certas modalidades, os anticorpos descritos no presente documento iniciam a depleção celular mediada por macrófagos. Em certas modalidades, os anticorpos descritos no presente documento são usados para o tratamento de tumores infiltrados com macrófagos. Em certas modalidades, os anticorpos descritos no presente documento esgotam seletivamente células T reguladoras intratumorais.

[0160] Em certas modalidades, um anticorpo descrito no presente é um anticorpo ativável que em um estado ativado se liga à proteína CTLA-4 humano. Em certas modalidades, o anticorpo ativável compreende uma porção de mascaramento que inibe a ligação do anticorpo em um estado

não clivado à proteína de CTLA-4 humano e pelo menos uma porção clivável acoplada ao anticorpo, por exemplo, em que a porção clivável a um polipeptídeo que funciona como um substrato para uma proteinase que é enriquecida no microambiente tumoral. Anticorpos ativáveis exemplificativos são descritos, por exemplo, nas Patentes nº US 8.513.390 e 8.518.404, e nas Publicações de Pedido de Patente nº US 2014/0255313, US 2014/0010810, US 2014/0023664, que estão incorporadas ao presente documento a título de referência. Em certas modalidades, o anticorpo ativável compreende uma região constante da cadeia pesada da IgG humana que é uma variante de uma região constante da cadeia pesada da IgG humana do tipo selvagem, em que a região constante da cadeia pesada da IgG humana se liga à FcγRIIIA humana com afinidade superior à região constante da cadeia pesada de IgG humana do tipo selvagem liga-se ao FcγRIIIA humano.

[0161] Em certas modalidades, uma, duas ou mais mutações (por exemplo, substituições de aminoácidos) são introduzidas na região Fc de um anticorpo descrito no presente documento (por exemplo, domínio CH2 (resíduos 231-340 da IgG1 humana) e/ou CH3 domínio (resíduos 341-447 da IgG1 humana) e/ou a região dobradiça, numerada de acordo com o sistema de numeração da UE, para alterar uma ou mais propriedades funcionais do anticorpo, como semivida no soro, fixação do complemento, ligação ao receptor Fc e/ou citotoxicidade celular dependente de antígeno.

[0162] Em certas modalidades, uma, duas ou mais mutações (por exemplo, substituições de aminoácidos) são introduzidas na região dobradiça da região Fc (domínio CH1) tal que o número de resíduos de cisteína na região dobradiça é alterado (por exemplo, aumentada ou diminuída) tal conforme descrito em, por exemplo, Patente nº US 5.677.425, incorporada ao presente documento a título de referência em sua totalidade. O número de resíduos de cisteína na região de dobradiça do domínio CH1 pode ser alterado para, por exemplo, facilitar a montagem das cadeias leves e pesadas, ou para alterar (por exemplo, aumentar ou diminuir) a estabilidade do anticorpo.

[0163] Em uma modalidade específica, uma, duas ou mais mutações de aminoácidos (por exemplo, substituições, inserções ou deleções) são introduzidas em um domínio constante de IgG, ou fragmento de ligação a FcRn do mesmo (preferivelmente um fragmento de domínio Fc ou de dobradiça-Fc) para alterar (por exemplo, diminuir ou aumentar) a meia-vida do anticorpo in vivo. Consulte, por exemplo, as Publicações Internacionais n° WO 02/060919; WO 98/23289; e WO 97/34631; e as Patentes n° US 5.869.046, 6.121.022, 6.277.375 e 6.165.745, todas as quais estão incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade, para exemplos de mutações que irão alterar (por exemplo, diminuir ou aumentar) a semivida de um anticorpo in vivo. Em algumas modalidades, uma, duas ou mais mutações de aminoácidos (por exemplo, substituições, inserções ou deleções) são introduzidas em um domínio constante de IgG ou um fragmento do mesmo de ligação a FcRn (preferivelmente um fragmento de domínio Fc ou de dobradiça-Fc) para diminuir a semi-vida do anticorpo in vivo. Em outras modalidades, uma, duas ou mais mutações de aminoácidos (por exemplo, substituições, inserções ou deleções) são introduzidas em um domínio constante de IgG ou fragmento de ligação a FcRn do mesmo (de preferência, um fragmento do domínio Fc ou dobradiça) para aumentar a meia -vida do anticorpo in vivo. Em uma modalidade específica, os anticorpos podem ter uma ou mais mutações de aminoácidos (por exemplo, substituições) no segundo domínio constante (CH2) (resíduos 231-340 da IgG1 humana) e/ou o terceiro domínio constante (CH3) (resíduos 341-447 de IgG1 humano), numeradas de acordo com o sistema de numeração da UE. Em uma modalidade específica, a região constante da IgG1 de um anticorpo descrito no presente documento compreende uma substituição de metionina (M) a tirosina (Y) na posição 252, uma substituição de serina (S) a treonina (T) na posição 254 e uma treonina (T) para substituição do ácido glutâmico (E) na posição 256, numerada de acordo com o sistema de numeração da UE. Consulte a Patente n° US 7.658.921, que está incorporada ao presente documento a título de referência

em sua totalidade. Esse tipo de IgG mutante, conhecido como “mutante YTE”, demonstrou apresentar uma semi-vida quadruplamente aumentada em comparação com as versões de tipo selvagem do mesmo anticorpo (consulte Dall'Acqua WF et al, (2006) J Biol Chem 281:23514-24, que está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade). Em certas modalidades, um anticorpo compreende um domínio constante de IgG que compreende uma, duas, três ou mais substituições de aminoácidos de resíduos de aminoácidos nas posições 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 e 428-436, numeradas de acordo com o sistema de numeração da UE.

[0164] Em algumas modalidades, uma, duas ou mais mutações (por exemplo, substituições de aminoácidos) são introduzidas na região Fc de um anticorpo descrito no presente documento (por exemplo, domínio CH2 (resíduos 231-340 da IgG1 humana) e/ou CH3 domínio (resíduos 341-447 da IgG1 humana) e/ou a região de dobradiça, numerada de acordo com o sistema de numeração EU, para aumentar ou diminuir a afinidade do anticorpo por um receptor Fc (por exemplo, um receptor Fc ativado) na superfície de uma célula efetora. As mutações na região Fc de um anticorpo que diminuem ou aumentam a afinidade de um anticorpo para um receptor Fc e técnicas para introdução de tais mutações no receptor Fc ou seu fragmento são conhecidas pelos versados na técnica. Exemplos de mutações no receptor Fc de um anticorpo que podem ser realizadas para alterar a afinidade do anticorpo para um receptor Fc são descritos em, por exemplo, Smith P et al., (2012) PNAS 109: 6.181 a 6.186, Patente nº US 6.737.056 e Publicações Internacionais nº WO 02/060919; WO 98/23289; e WO 97/34631, todos os quais estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0165] Em uma modalidade adicional, uma, duas ou mais substituições de aminoácidos são introduzidas em uma região Fc de domínio constante de IgG para alterar a) função (ou funções) efetora do anticorpo. Por exemplo, um ou mais aminoácidos selecionados dos resíduos de aminoácidos

234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 e 322, numerados de acordo com o sistema de numeração da UE, podem ser substituídos por um resíduo de aminoácido diferente, de modo que o anticorpo tem uma afinidade alterada para um ligante efetor, mas retém a capacidade de ligação ao antígeno do anticorpo progenitor. O ligante efetor para o qual a afinidade é alterada pode ser, por exemplo, um receptor Fc ou o componente CI do complemento. Essa abordagem é descrita com mais detalhe nas Patentes nº US 5.624.821 e 5.648.260, cada uma das quais está incorporada ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Em algumas modalidades, a eliminação ou inativação (através de mutações pontuais ou outros meios) de um domínio da região constante pode reduzir a ligação ao receptor Fc do anticorpo circulante, aumentando assim a localização do tumor. Consulte, por exemplo, as Patentes nº US 5.585.097 e 8.591.886, cada uma das quais está incorporada ao presente documento a título de referência em sua totalidade, para uma revelação de mutações que eliminam ou inativam o domínio constante e desse modo aumentam a localização do tumor. Em certas modalidades, uma ou mais substituições de aminoácidos podem ser introduzidas na região Fc de um anticorpo descrito no presente documento para remover potenciais sítios de glicosilação na região Fc, o que pode reduzir a ligação ao receptor Fc (consulte, por exemplo, Shields RL et al., 2001). J Biol Chem 276: 6591-604, que está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade). Em várias modalidades, uma ou mais das seguintes mutações na região constante de um anticorpo descrito no presente documento podem ser realizadas: uma substituição N297A; uma substituição N297Q; uma substituição L235A e uma substituição L237A; uma substituição L234A e uma substituição L235A; uma substituição E233P; uma substituição L234V; uma substituição L235A; uma deleção C236; uma substituição P238A; uma substituição D265A; uma substituição A327Q; ou uma substituição P329A, numerada de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, uma mutação selecionada do grupo que consiste em D265A, P329A e uma combinação das mesmas, numerada de acordo com

o sistema de numeração da UE, pode ser feita na região constante de um anticorpo descrito no presente documento.

[0166] Em uma modalidade específica, um anticorpo descrito no presente documento compreende o domínio constante de uma IgG1 com uma substituição de aminoácido N297Q ou N297A, numerada de acordo com o sistema de numeração da UE. Em uma modalidade, um anticorpo descrito no presente documento compreende o domínio constante de uma IgG1 com uma mutação selecionada do grupo que consiste em D265A, P329A e uma combinação das mesmas, numerada de acordo com o sistema de numeração da UE. Em outra modalidade, um anticorpo descrito no presente documento compreende o domínio constante de uma IgG1 com uma mutação selecionada do grupo que consiste em L234A, L235A e uma combinação das mesmas, numerada de acordo com o sistema de numeração da UE. Em certas modalidades, os resíduos de aminoácidos na região constante de um anticorpo descrito no presente documento nas posições correspondentes às posições L234, L235 e D265 em uma cadeia pesada de IgG1 humana, numerados de acordo com o sistema de numeração EU, não são L, L e D, respectivamente. Essa abordagem é descrita em detalhe na Publicação Internacional nº WO 14/108483, que está incorporada ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Em uma modalidade particular, os aminoácidos correspondentes às posições L234, L235 e D265 em uma cadeia pesada de IgG1 humana são F, E e A; ou A, A e A, respectivamente, numerados de acordo com o sistema de numeração da UE.

[0167] Em certas modalidades, um ou mais aminoácidos selecionados dos resíduos de aminoácidos 329, 331 e 322 na região constante de um anticorpo descrito no presente documento, numerados de acordo com o sistema de numeração da UE, podem ser substituídos por um resíduo de aminoácido diferente de modo que anticorpo tenha alterado a ligação de Clq e/ou reduzido ou abolido a citotoxicidade dependente do complemento (CDC). Essa abordagem é descrita em maior detalhe na Patente nº US 6.194.551

(Idusogie et al), que está incorporada ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Em algumas modalidades, um ou mais resíduos de aminoácidos nas posições de aminoácido 231 a 238 na região N-terminal do domínio CH2 de um anticorpo descrito no presente documento são alterados para desse modo alterar a capacidade de o anticorpo fixar o complemento, numerado de acordo com o Sistema de numeração da UE. Essa abordagem é descrita adicionalmente na Publicação Internacional n° WO 94/29351, que está incorporada ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Em certas modalidades, a região Fc de um anticorpo descrito no presente documento é modificada para aumentar a capacidade de o anticorpo mediar a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) e/ou aumentar a afinidade do anticorpo por um receptor Fey por mutação de um ou mais aminoácidos (por exemplo, introduzindo substituições de aminoácidos) nas seguintes posições: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 ou 439, numerados de acordo com o sistema de numeração da UE. Essa abordagem é descrita adicionalmente na Publicação Internacional n° WO 00/42072, que está incorporada ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0168] Em certas modalidades, um anticorpo descrito no presente documento compreende a região constante de um anticorpo IgG4 e a serina no resíduo de aminoácido 228 da cadeia pesada, numerada de acordo com o sistema de numeração da UE, é substituída por prolina.

[0169] Em certas modalidades, qualquer uma das mutações ou modificações da região constante descrita no presente documentos pode ser introduzida em uma ou ambas as regiões constantes da cadeia pesada de um anticorpo descrito no presente documento que tem duas regiões constantes de cadeia pesada.

[0170] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e funciona como um antagonista.

[0171] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e diminui a atividade de CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) em pelo menos 5%, 10 %, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99% como avaliado pelos métodos descritos no presente documento e/ou conhecidos de um versado na técnica, em relação à atividade de CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) sem qualquer anticorpo ou com um anticorpo não relacionado (por exemplo, um anticorpo que não se liga especificamente ao CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano)). Em certas modalidades, a presente divulgação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e diminui a atividade de CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) em pelo menos cerca de 1,2 vezes, 1,3 vezes, 1,4 vezes, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes, ou 100 vezes conforme avaliado pelos métodos descritos no presente documento e/ou conhecidos de um versado na técnica, em relação à atividade de CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) sem qualquer anticorpo ou com um anticorpo não relacionado (por exemplo, um anticorpo que não se liga especificamente ao CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano)). Exemplos não limitantes da atividade de CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) podem incluir sinalização de CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), ligante (por exemplo, CD80 ou CD86), e inibição da produção de citocinas (por exemplo, IL-2, IFN- γ ou TNF- α). Em certas modalidades, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e desativa,

reduz ou inibe uma atividade de CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano). Em modalidades específicas, uma diminuição em uma atividade de CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) avaliada conforme descrito nos Exemplos, infra.

[0172] Em modalidades específicas, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e reduz a ligação de CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) ao seu ligante (por exemplo, CD80 ou CD86) em pelo menos cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75 %, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% ou 99%, conforme avaliado por métodos conhecidos de um perito na técnica, em relação à ligação CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) à sua ligante (por exemplo, CD80 ou CD86) sem qualquer anticorpo ou com um anticorpo não relacionado (por exemplo, um anticorpo que não se liga especificamente ao CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano)). Em modalidades específicas, a presente descrição fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e reduz a ligação de CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) ao seu ligante (por exemplo, CD80 ou CD86) pelo menos cerca de 1,2 vezes, 1,3 vezes, 1,4 vezes, 1,5 vezes, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes, ou 100 vezes, como avaliado por métodos conhecidos pelos versados na técnica, relativamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) se ligante ao seu ligante (por exemplo, CD80 ou CD86) sem qualquer anticorpo ou com um anticorpo não relacionado (por exemplo, um anticorpo que não se liga especificamente ao CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano)).

[0173] Em modalidades específicas, a presente revelação fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente ao CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e aumenta a produção de citocinas (por exemplo, IL-2, IFN- γ ou TNF- α) por pelo menos cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%,

90%, 95%, 98% ou 99%, conforme avaliado pelos métodos descritos no presente documento (consulte os Exemplos, infra) ou conhecido de um versado na técnica, relativamente produção de citocina sem qualquer anticorpo ou com um anticorpo não relacionado (por exemplo, um anticorpo que não se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano). Em modalidades específicas, a presente descrição fornece um anticorpo isolado que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e aumenta a produção de citocinas (por exemplo, IL-2, IFN- γ ou TNF- α) em pelo menos cerca de 1,2 vez, 1,3 vez, 1,4 vez, 1,5 vez, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes, 15 dobrar, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes, ou 100 vezes, como avaliado pelos métodos descritos no presente documento (consulte os Exemplos, infra) ou conhecidos de um versado na técnica, relativa produção de citocina sem qualquer anticorpo ou com um anticorpo não relacionado (por exemplo, um anticorpo que não se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano).

[0174] Em certas modalidades, células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) estimuladas com Enterotoxina Estafilocócica A (SEA) na presença de um anticorpo descrito no presente documento, que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), aumentaram Produção de IL-2 em pelo menos cerca de 1,2 vez, 1,3 vez, 1,4 vez, 1,5 vez, 2 vezes, 2,5 vezes, 3 vezes, 3,5 vezes, 4 vezes, 4,5 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9 vezes, 10 vezes, 15 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes, ou 100 vezes em relação a PBMCs estimuladas apenas com AAE sem qualquer anticorpo ou com uma relação não relacionada anticorpo (por exemplo, um anticorpo que não se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), como avaliado pelos métodos descritos no presente documento (consulte os Exemplos, infra) ou conhecido de um versado na técnica.

6.3 COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

[0175] São no presente documento fornecidas composições que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento que tem o grau de pureza desejado em um carreador, excipiente ou estabilizante fisiologicamente aceitável (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Os carreadores, excipientes ou estabilizantes aceitáveis são não tóxicos para os receptores nas dosagens e concentrações empregadas, e incluem tampões como fosfato, citrato e outros ácidos orgânicos; antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (como cloreto de octadecildimetilbenzilamônio; cloreto de hexametônio; cloreto de benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, álcool butílico ou benzílico; alquilparabenos como metil ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos de cerca de 10 resíduos); proteínas, como albumina de soro, gelatina ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos e outros hidratos de carbono incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes, como EDTA; açúcares como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; contraíons formadores de sal, como sódio; complexos de metais (por exemplo, complexos de proteína Zn); e/ou tensoativos não iônicos como TWEEN™, PLURONICS™ ou polietilenoglicol (PEG).

[0176] Em uma modalidade específica, as composições farmacêuticas compreendem um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, e opcionalmente um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos adicionais, em um carreador farmacêuticamente aceitável. Em uma modalidade específica, as composições farmacêuticas compreendem uma quantidade eficaz de um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento e, opcionalmente, um ou mais agentes profiláticos ou terapêuticos adicionais, em um carreador farmacêuticamente

aceitável. Em algumas modalidades, o anticorpo é o único ingrediente ativo incluído na composição farmacêutica. As composições farmacêuticas descritas no presente documento podem ser úteis na inibição da atividade de CTLA-4 e no tratamento de uma condição, como câncer ou uma doença infecciosa.

[0177] Em um aspecto, é fornecido no presente documento uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável, para utilização como um medicamento.

[0178] Em um aspecto, é fornecida no presente documento uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável, para utilização em um método para o tratamento de câncer.

[0179] Os carreadores farmacêuticamente aceitáveis usados em preparações parentéricas incluem carreadores aquosos, carreadores não aquosos, agentes antimicrobianos, agentes isotônicos, tampões, antioxidantes, anestésicos locais, agentes de suspensão e dispersão, agentes emulsionantes, agentes sequestrantes ou quelantes e outras substâncias farmacêuticamente aceitáveis. Exemplos de carreadores aquosos incluem Injeção de Cloreto de Sódio, Injeção de Ringer, Injeção de Dextrose Isotônica, Injeção de Água Estéril, Injeção de Dextrose e Ringer Lactada. Carreadores parenterais não aquosos incluem óleos fixos de origem vegetal, óleo de semente de algodão, óleo de milho, óleo de gergelim e óleo de amendoim. Agentes antimicrobianos em concentrações bacteriostáticas ou fungistáticas podem ser adicionados a preparações parenterais embaladas em recipientes de dose múltipla que incluem fenóis ou cresóis, mercuriais, álcool benzílico, clorobutanol, ésteres de ácido metílico e propil p-hidroxibenzoico, timerosal, cloreto de benzalcônio e cloreto de benzetônio. Agentes isotônicos incluem cloreto de sódio e dextrose. Tampões incluem fosfato e citrato. Antioxidantes incluem bissulfato de sódio. Os anestésicos locais incluem o cloridrato de procaína. Agentes de suspensão e dispersão incluem

carboximetilcelulose de sódio, hidroxipropilmetilcelulose e polivinilpirrolidona. Os agentes emulsionantes incluem o Polissorbato 80 (TWEEN® 80). Um agente sequestrante ou quelante de íons metálicos inclui EDTA. Os carreadores farmacêuticos também incluem álcool etílico, polietilenoglicol e propilenoglicol para carreadores miscíveis em água; e hidreto de sódio, ácido clorídrico, ácido cítrico ou ácido láctico para ajuste do pH.

[0180] Uma composição farmacêutica pode ser formulada para qualquer via de administração para um indivíduo. Exemplos específicos de vias de administração incluem intranasal, oral, pulmonar, transdérmica, intradérmica e parentérica. A administração parenteral, caracterizada por injeção subcutânea, intramuscular ou intravenosa, também é contemplada no presente documento. Os injetáveis podem ser preparados em formas convencionais, como soluções ou suspensões líquidas, formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injeção, ou como emulsões. Os injetáveis, soluções e emulsões também contêm um ou mais excipientes. Excipientes adequados são, por exemplo, água, solução salina, dextrose, glicerol ou etanol. Adicionalmente, se desejado, as composições farmacêuticas a serem administradas podem também conter quantidades menores de substâncias auxiliares não tóxicas, como agentes umectantes ou emulsionantes, agentes tampão de pH, estabilizadores, melhoradores de solubilidade e outros agentes, como, por exemplo, sódio acetato, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina e ciclodextrinas.

[0181] Preparações para administração parentérica de um anticorpo incluem soluções estéreis prontas para injeção, produtos secos solúveis estéreis, como pós liofilizados, prontos para serem combinados com um solvente imediatamente antes do uso, incluindo comprimidos hipodérmicos, suspensões estéreis prontas para injeção, estéreis produtos insolúveis secos prontos para serem combinados com um veículo imediatamente antes do uso e emulsões estéreis. As soluções podem ser aquosas ou não aquosas.

[0182] Se administrados intravenosamente, os carreadores adequados incluem solução salina fisiológica ou solução salina tamponada com fosfato (PBS) e soluções contendo agentes espessantes e solubilizantes, como glucose, polietilenoglicol e polipropilenoglicol e misturas dos mesmos.

[0183] Misturas tópicas que compreende um anticorpo são preparadas conforme descrito para a administração local e sistêmica. A mistura resultante pode ser uma solução, suspensão, emulsões ou semelhantes e pode ser formulada como cremes, géis, unguentos, emulsões, soluções, elixires, loções, suspensões, tinturas, pastas, espumas, aerossóis, irrigações, sprays, supositórios, ligaduras, emplastros dérmicos ou quaisquer outras formulações adequadas para administração tópica.

[0184] Um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento pode ser formulado como um aerossol para aplicação tópica, como por inalação (consulte, por exemplo, Patentes nº US 4.044, 126, 4.414.209 e 4.364.923, que descrevem aerossóis para entrega de um esteroide útil para o tratamento de doenças inflamatórias, particularmente asma e estão incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade). Estas formulações para administração ao trato respiratório podem estar na forma de um aerossol ou solução para um nebulizador, ou como um pó microfino para insuflações, sozinhos ou em combinação com um carreador inerte como lactose. Nesse caso, as partículas da formulação terão, em uma modalidade, diâmetros inferiores a 50 microns, em uma modalidade inferior a 10 microns.

[0185] Um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento pode ser formulado para aplicação local ou tópica, como para aplicação tópica na pele e membranas mucosas, como no olho, na forma de géis, cremes e loções e para aplicação no olho ou para intracistema ou aplicação intraespinal. A administração tópica é contemplada para administração transdérmica e também para administração nos olhos ou

mucosa, ou para terapias de inalação. Podem também ser administradas soluções nasais do anticorpo sozinho ou em combinação com outros excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

[0186] Emplastos transdérmicos, incluindo dispositivos iontoforéticos e eletroforéticos, são bem conhecidos dos versados na técnica, e podem ser usados para administrar um anticorpo. Por exemplo, tais emplastos são revelados nas Patentes nº US 6.267.983, 6.261.595, 6.256.533, 6.167.301, 6.024.975, 6.010.715, 5.985.317, 5.983.134, 5.948.433 e 5.860.957, todas as quais estão incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0187] Em certas modalidades, uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento é um pó liofilizado, que pode ser reconstituído para administração como soluções, emulsões e outras misturas. Também pode ser reconstituído e formulado como sólidos ou géis. O pó liofilizado é preparado dissolvendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento, ou um derivado farmaceuticamente aceitável do mesmo, em um solvente adequado. Em algumas modalidades, o pó liofilizado é estéril. O solvente pode conter um excipiente que melhora a estabilidade ou outro componente farmacológico do pó ou solução reconstituída, preparada a partir do pó. Excipientes que podem ser usados incluem, mas não estão limitados a, dextrose, sorbitol, frutose, xarope de milho, xilitol, glicerina, glucose, sacarose ou outro agente adequado. O solvente também pode conter um tampão, como citrato, fosfato de sódio ou potássio ou outro tal tampão conhecido pelos versados na técnica, em uma modalidade, quase pH neutro. A subsequente filtração esterilizada da solução, seguida de liofilização sob condições convencionais conhecidas pelos versados na técnica, fornece a formulação desejada. Em uma modalidade, a solução resultante será adicionada em frascos para liofilização. Cada frasco conterá uma dose única ou múltiplas dosagens do composto. O pó liofilizado pode ser

armazenado em condições apropriadas, como a cerca de 4 °C até à temperatura ambiente. A reconstituição deste pó liofilizado com água para injeção fornece uma formulação para utilização na administração parentérica. Para reconstituição, o pó liofilizado é adicionado a água estéril ou outro carreador adequado. A quantidade precisa depende do composto selecionado. Tal quantidade pode ser determinada empiricamente.

[0188] Os anticorpos anti-CTLA-4 descritos no presente documento e outras composições no presente documento fornecidas podem também ser formulados para serem dirigidos a um tecido, receptor ou outra área particular do corpo do indivíduo a ser tratado. Muitos desses métodos de direcionamento são bem conhecidos dos versados na técnica. Todos esses métodos de direcionamento são contemplados no presente documento para utilização nas presentes composições. Para exemplos não limitativos de métodos de direcionamento, consulte, por exemplo, as Patentes n° US 6.316.652, 6.274.552, 6.271.359, 6.253.872, 6.139.865, 6.131.570, 6.120.751, 6.071.495, 6.060.082, 6.048.736, 6.039.975, 6.004.534, 5.985.307, 5.972.366, 5.900.252, 5.840.674 5.759.542 e 5.709.874, todos os quais estão incorporados ao presente documentos a título de referência em sua totalidade. Em uma modalidade específica, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento é direcionado para um tumor.

[0189] As composições a serem utilizadas para administração in vivo podem ser estéreis. Isso é prontamente realizado por filtração através de, por exemplo, membranas de filtração estéreis.

6.4 MÉTODOS DE Uso E Usos

[0190] Em um outro aspecto, a presente revelação fornece um método de tratamento de um indivíduo usando os anticorpos anti-CTLA-4 descritos no presente documento. Qualquer doença ou distúrbio em um indivíduo que beneficiaria da inibição da função de CTLA-4 pode ser tratada utilizando os anticorpos anti-CTLA-4 descritos no presente documento. Os

anticorpos anti-CTLA-4 descritos no presente documento são particularmente úteis para inibir a tolerância do sistema imune a tumores e, conseqüentemente, podem ser usados como imunoterapia para indivíduos com câncer. Por exemplo, em certas modalidades, a presente revelação fornece um método para aumentar a ativação de células T em resposta a um antígeno em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CTLA-4 ou uma composição farmacêutica do mesmo, conforme descrito no presente documento. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um método de tratamento do câncer em um indivíduo, em que o método compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz do anticorpo ou composição farmacêutica, conforme descrito no presente documento.

[0191] Os cânceres que podem ser tratados com os anticorpos, combinações terapêuticas ou composições farmacêuticas descrita no presente documentos incluem, sem limitação, câncer sólido (por exemplo, câncer sólido recidivado ou refratário e câncer sólido avançado ou metastático), carcinoma, sarcoma, melanoma (por exemplo, estágio Melanoma III ou estágio IV), câncer de pulmão de pequenas células, câncer de pulmão de não pequenas células, câncer urotelial, câncer de ovário, câncer de próstata (por exemplo, câncer de próstata metastático refratário a hormônio e câncer de próstata metastático progressivo), câncer de pâncreas, câncer de mama HER2+ (por exemplo, câncer de mama HER2+ recidivado/refratário), câncer de cabeça e pescoço (por exemplo, carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço recaída/refratária (CECP)), glioma, glioma maligno, glioblastoma multiforme, metástase cerebral, câncer de merkel, câncer gástrico, câncer gastroesofágico, carcinoma de células renais, melanoma uveal, câncer de cólon, câncer do colo do útero, linfoma (por exemplo, linfoma recidivante ou refratário), linfoma não-Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia e mieloma múltiplo. Em certas modalidades, o câncer é tratado com administração intratumoral de um anticorpo, combinação terapêutica ou composição farmacêutica descrita no

presente documento. Os cânceres que podem ser tratados com administração intratumoral dos anticorpos, combinações terapêuticas ou composições farmacêuticas descrita no presente documentos incluem, sem limitação, tumores sólidos (por exemplo, tumores sólidos avançados ou metastáticos), câncer de cabeça e pescoço (por exemplo, cabeça e pescoço recidivantes/refratários). carcinoma espinocelular (HNSCC)) e câncer de mama (por exemplo, câncer de mama HER2+ (por exemplo, câncer de mama HER2+ recidivado/refratário).

[0192] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é um tumor sólido. Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é um câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, um tumor sólido metastático ou localmente avançado). Em certas modalidades, o câncer é tratado de acordo com um método descrito no presente documento como uma primeira terapia de câncer após o diagnóstico do tumor metastático ou localmente avançado (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico). Em certas modalidades, o câncer é tratado de acordo com um método descrito no presente documento como a primeira terapia do câncer após o diagnóstico da progressão do tumor (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico de progressão tumoral) que ocorreu apesar do tratamento prévio do tumor com uma terapia de câncer diferente, opcionalmente método descrito no presente documento é fornecido como a segunda terapia de câncer administrada. Em certas modalidades, o câncer é tratado de acordo com um método descrito no presente documento como a primeira terapia de câncer após o diagnóstico de toxicidade de uma terapia de câncer diferente (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico da toxicidade da diferente terapia de câncer), opcionalmente, em que o modo descrito no presente documento

fornecido como a segunda terapia de câncer administrada. Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é um câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) para o qual não existe terapia padrão disponível. Em outras modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é um câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) para o qual uma terapia padrão falhou (isto é, o câncer progrediu após a terapia padrão). Em certas modalidades, uma terapia falha se o câncer for refratário à terapia. Em certas modalidades, uma terapia falha se o câncer recair após responder, total ou parcialmente, à terapia. Em certas modalidades, o câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) foi confirmado histológica ou citologicamente.

[0193] Em certas modalidades, o câncer é um tumor sólido. Em certas modalidades, o câncer (por exemplo, tumor sólido) expressa PD-L1. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer (por exemplo, tumor sólido) que exibe expressão detectável (por exemplo, expressão parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 1% (por exemplo, pelo menos 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%). Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer (por exemplo, tumor sólido) que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1% (por exemplo, pelo menos 2 %, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%). Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer (por exemplo, tumor sólido) que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer (por exemplo, tumor sólido) que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-

L1 é de pelo menos 5%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer (por exemplo, tumor sólido) que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 25%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer (por exemplo, tumor sólido) que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 50%.

[0194] Em certas modalidades, o câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) expressa PD-L1. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) que exibe expressão detectável (por exemplo, expressão parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 1% (por menos 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%). Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1% (por exemplo, pelo menos 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%). Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 5%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou

completa) de PD-L1 é de pelo menos 25%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer metastático ou localmente avançado (por exemplo, tumor sólido) que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 50%.

[0195] Para cada um dos métodos descritos no presente documento que requerem uma certa porcentagem de células em uma amostra que exibem expressão detectável (por exemplo, expressão de membrana, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1, a expressão de PD-L1 pode ser detectada por qualquer método bem conhecido na técnica, incluindo mas não limitado a imuno-histoquímica. Ensaio imuno-histoquímico exemplares para medir a expressão de PD-L1 em células tumorais são fornecidos em Hirsch et al. (2017, J. Thoracic Oncol. 12 (2): 208 a 222), Rimm et al. (2017, JAMA Oncol. 3 (8):1.051 a 1.058), e Diggs e Hsueh (2017, Biomarker Res. 5: 12), que estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0196] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com um método descrito no presente documento é um câncer do pulmão de células não pequenas metastático ou localmente avançado (NSCLC). Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com um método descrito no presente documento é um câncer do pulmão de células não pequenas metastático (NSCLC). Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com um método descrito no presente documento é um NSCLC de Estágio IV, metastático ou localmente avançado. Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com um método descrito no presente documento é um NSCLC metastático de fase IV. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC metastático ou localmente avançado que exibe expressão detectável (por exemplo, expressão parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80 ou 90%. Em certas modalidades, a porcentagem de

células tumorais em uma amostra do NSCLC metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1%, 2%, 3%, 4 %, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 1%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 5%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é de pelo menos 25%. Em certas modalidades, a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC metastático ou localmente avançado que exibe expressão de membrana detectável (por exemplo, expressão de membrana parcial ou completa) de PD-L1 é pelo menos 50%. Em certas modalidades, o NSCLC metastático ou localmente avançado não tem aberrações do tumor genômico de EGFR ou ALK. Em certas modalidades, o NSCLC metastático ou localmente avançado não tem mutação sensibilizadora de EGFR (por exemplo, mutação que é susceptível ao tratamento com um inibidor de tirosina cinase incluindo erlotinib, gefitinib ou afatanib) ou translocação de ALK. Em certas modalidades, o indivíduo que tem o NSCLC metastático ou localmente avançado não recebeu nenhum tratamento de quimioterapia sistêmica anterior para NSCLC metastático ou localmente avançado. Em certas modalidades, o NSCLC metastático ou localmente avançado é tratado de acordo com um método descrito no presente documento como uma primeira terapia de câncer após o diagnóstico (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1,

2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico) do NSCLC metastático ou localmente avançado. Em certas modalidades, o método compreende tratar um indivíduo com NSCLC (por exemplo, Estágio IV, NSCLC metastático ou localmente avançado) usando um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, por exemplo, AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4, em que a porcentagem de células tumorais em uma amostra do NSCLC que exibe expressão detectável da membrana (por exemplo, expressão parcial ou total da membrana) de PD-L1 é pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%, e em que o método é fornecido como uma primeira terapia de câncer após o diagnóstico do câncer do colo do útero (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico).

[0197] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é um câncer do colo do útero. Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é um carcinoma de células escamosas metastático ou localmente avançado, irressecável, carcinoma adeno-escamoso ou adenocarcinoma do colo do útero. Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é um câncer do colo do útero irressecável ou metastático. Em certas modalidades, o câncer do colo do útero progrediu após uma terapia padrão (por exemplo, recaiu após a terapia padrão, ou é refratária à terapia padrão). Em certas modalidades, a terapia padrão compreende uma quimioterapia contendo platina. Em certas modalidades, a quimioterapia contendo platina selecionada do grupo que consiste em cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, nedaplatina, satraplatina, picoplatina, triplatina, fenantrina, iproplatina, lobapatina, heptaplatina, lipoplatina e uma combinação das mesmas. Em certas modalidades, a terapia padrão compreende ainda uma segunda quimioterapia. Em certas modalidades, a segunda quimioterapia é selecionada do grupo que consiste em

um análogo de nucleotídeo (por exemplo, gemcitabina), um antimetabolito de folato (por exemplo, pemetrexed) e um taxano (por exemplo, paclitaxel). Em certas modalidades, a terapia padrão é qualquer quimioterapia de duplete baseada em platina (PT-DC) (também conhecida como duplete contendo platina) conhecida na técnica. Em certas modalidades, a PT-DC compreende cisplatina e gemcitabina, cisplatina e pemetrexed, cisplatina e paclitaxel, carboplatina e paclitaxel, ou cisplatina e topotecano. A terapia padrão (por exemplo, uma que compreende uma PT-DC) pode opcionalmente adicionalmente compreender uma ou mais terapias adicionais, como bevacizumab. Em certas modalidades, a terapia padrão compreende paclitaxel e topotecano. Em certas modalidades, o câncer do colo do útero é positivo para HPV. Em certas modalidades, o câncer do colo do útero está associado à instabilidade dos microssatélites. Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é um carcinoma de células escamosas metastático ou localmente avançado, irressecável, carcinoma adeno-escamoso ou adenocarcinoma do colo do útero que recaiu após um duplete contendo platina administrado para tratamento de avançado, irressecável ou metastático). Em certas modalidades, o câncer do colo do útero é tratado de acordo com um método descrito no presente documento como uma primeira terapia de câncer após o diagnóstico do câncer do colo do útero (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico). Em certas modalidades, o câncer do colo do útero é tratado de acordo com um método descrito no presente documento como a primeira terapia do câncer após o diagnóstico da progressão do tumor (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico de progressão tumoral) que ocorreu apesar do tratamento prévio do câncer do colo do útero com um terapia de câncer, opcionalmente em que o método descrito no presente documento é fornecido como a segunda terapia de câncer administrada. Em certas modalidades, o câncer do colo do útero é tratado de

acordo com um método descrito no presente documento como a primeira terapia de câncer após o diagnóstico de toxicidade de uma terapia de câncer diferente (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico de toxicidade da terapia de câncer diferente), opcionalmente em que o modo descrito no presente documento é fornecido como a segunda terapia de câncer administrada. Em certas modalidades, o método compreende tratar um indivíduo com câncer do colo do útero (por exemplo, um carcinoma de células escamosas metastático ou localmente avançado, irresssecável, carcinoma adeno-escamoso ou adenocarcinoma do colo do útero) utilizando um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, por exemplo, AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330M332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4, em que o método é fornecido como uma primeira terapia de câncer após o diagnóstico do câncer do colo do útero (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 dias, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico). Em certas modalidades, o método compreende tratar um indivíduo com câncer do colo do útero (por exemplo, um carcinoma de células escamosas metastático ou localmente avançado, irresssecável, carcinoma adeno-escamoso ou adenocarcinoma do colo do útero) utilizando um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, por exemplo, AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou composição farmacêutica que compreende tal anticorpo anti-CTLA-4, em que o método é fornecido após o diagnóstico da progressão do tumor (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico de progressão do tumor) que ocorreu apesar do tratamento prévio do câncer do colo do útero com uma terapia de câncer diferente, ou fornecida após o diagnóstico de toxicidade de uma terapia de câncer diferente (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas; ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico da toxicidade da diferente terapia de câncer), e em que o modo descrito no

presente documento fornecido como a segunda terapia de câncer administrada.

[0198] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é um carcinoma de células escamosas cutâneo (cSCC). Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é um carcinoma das células escamosas cutâneas do Estágio IV (cSCC). Em certas modalidades, o cSCC (por exemplo, estágio IV cSCC) não é curável com a terapia de radiação. Em certas modalidades, o cSCC do Estágio IV é diagnosticado histológica ou citologicamente de acordo com a oitava edição do manual do American Joint Committee on Cancer staging (AJCC-8). Em certas modalidades, o cSCC (por exemplo, estágio IV cSCC) é tratado de acordo com um método descrito no presente documento como uma primeira terapia de câncer após o diagnóstico do cSCC (por exemplo, estágio IV cSCC) (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico). Em certas modalidades, o cSCC (por exemplo, cSCC de estágio IV) é tratado de acordo com um método descrito no presente documento como a primeira terapia de câncer após o diagnóstico de progressão do tumor (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5 ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico de progressão tumoral) que ocorreu apesar do tratamento prévio do CCSc (por exemplo, cSCC de Estágio IV) com uma terapia de câncer diferente, opcionalmente em que o método descrito no presente documento é fornecido como a segunda terapia de câncer administrada. Em certas modalidades, o cSCC (por exemplo, cSCC de estágio IV) é tratado de acordo com um método descrito no presente documento como a primeira terapia de câncer após o diagnóstico de toxicidade de uma terapia diferente de câncer (por exemplo, dentro de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 dias; 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 semanas, ou, 1, 2, 3, 4, 6, 8 ou 12 meses após o diagnóstico de toxicidade da terapia de

câncer diferente), opcionalmente em que o método descrito no presente documento é fornecido como a segunda terapia de câncer administrada.

[0199] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é o linfoma de células B (por exemplo, leucemia linfocítica crônica de células B, linfoma não Hodgkin de células B, linfoma cutâneo de células B, linfoma difuso de grandes células B), carcinoma basocelular, câncer de bexiga, blastoma, metástase cerebral, câncer de mama, linfoma de Burkitt, carcinoma (por exemplo, adenocarcinoma (por exemplo, da junção gastroesofágica), câncer do colo do útero, câncer de cólon, câncer colorretal (câncer de cólon e retal), carcinoma endometrial, câncer de esôfago, Sarcoma de Ewing, linfoma folicular, câncer gástrico, carcinoma de junção gastroesofágica, câncer gastrointestinal, glioblastoma (por exemplo, glioblastoma multiforme, por exemplo, recém-diagnosticado ou recorrente), glioma, câncer de cabeça e pescoço (por exemplo, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço) metástase, linfoma de Hodgkin e não-Hodgkin, câncer renal (por exemplo, carcinoma de células renais e tumores de Wilms), câncer de laringe, leucemia (por exemplo, leucemia mielocítica crônica, leucemia de células pilosas a), câncer de fígado (por exemplo, carcinoma hepático e hepatoma), câncer de pulmão (por exemplo, câncer pulmonar de células não pequenas e câncer de pulmão de pequenas células), linfoma linfoblástico, linfoma, linfoma de células do manto, tumor cerebral metastático, câncer metastático, mieloma (por exemplo, mieloma múltiplo), neuroblastoma, melanoma ocular, câncer orofaríngeo, osteossarcoma, câncer de ovário, câncer de pâncreas (por exemplo, adenocarcinoma ductal pancreatite), câncer de próstata (por exemplo, refratário a hormônios (por exemplo, resistente à castração), metastático, refratário a hormônio metastático (por exemplo, resistente à castração, independente de andrógeno), carcinoma de células renais (por exemplo, metastático), carcinoma de glândula salivar, sarcoma (por exemplo, rabdomiossarcoma), câncer de pele (por exemplo, melanoma (por exemplo, melanoma metastático)), sarcoma de

partes moles, carcinoma de células escamosas, sarcoma sinovial, câncer testicular, câncer de tireoide, câncer de células transicionais (câncer de células uroteliais), melanoma uveal (por exemplo, metastático), carcinoma verrucoso, câncer vulvar e macroglobulinemia de Waldenström.

[0200] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é sarcoma ou carcinoma humano, por exemplo, fibrossarcoma, mixossarcoma, lipossarcoma, condrossarcoma, sarcoma osteogênico, cordoma, angiossarcoma, endoteliolosarcoma, linfangiossarcoma, linfangioendoteliocarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiossarcoma, rabdomiossarcoma, carcinoma do cólon, câncer pancreático, câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma basocelular, adenocarcinoma, carcinoma da glândula sudorípara, carcinoma de glândula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogênico, carcinoma de células renais (por exemplo, metastático), hepatoma, carcinoma do ducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionário, tumor de Wilms, câncer do colo do útero, tumor testicular, carcinoma de pulmão, carcinoma de pulmão de pequenas células, carcinoma de bexiga, carcinoma epitelial, glioblastoma multiforme, astrocitoma, meduloblastoma, craniopharyngioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma ou retinoblastoma.

[0201] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é angiossarcoma.

[0202] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é uma leucemia linfocítica aguda ou leucemia mielocítica aguda (por exemplo, mieloblastos, promielocíticos, mielomonocíticos, monocíticos e eritroleucíticos); leucemia crônica (leucemia mielocítica crônica (granulocítica) ou leucemia linfocítica crônica); doença de Hodgkin; doença não-Hodgkin; leucemia mieloide aguda;

linfoma de células B; linfoma de células T; linfoma de células grandes anaplásicas; linfoma intraocular; linfoma folicular; linfoma do intestino delgado; ou linfoma de zona marginal esplênico.

[0203] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenstrom, doença em cadeia pesada, tumores estromais gastrointestinais, câncer da cabeça e/ou pescoço (por exemplo, carcinoma de células escamosas da hipofaringe, carcinoma de células escamosas da laringe, carcinoma celular da orofaringe, ou carcinoma verrucoso da laringe), sarcoma estromal endometrial, sarcoma de mastócitos, sarcoma adulto de partes moles, sarcoma uterino, carcinoma de células merkel, carcinoma urotelial, melanoma com metástases cerebrais, melanoma uveal, melanoma uveal com metástases hepáticas, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer retal ou síndrome mielodisplásica. Em algumas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos é metastático.

[0204] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento câncer da próstata, câncer da mama, câncer do pulmão, câncer colorretal, melanoma, câncer brônquico, câncer da bexiga, câncer do cérebro ou do sistema nervoso central, câncer do sistema nervoso periférico, câncer uterino ou endometrial, câncer de cavidade oral ou faringe, linfoma não-Hodgkin, câncer de tireoide, câncer renal, câncer do trato biliar, intestino delgado ou câncer de apêndice, câncer de glândula salivar, câncer de glândula tireoide, câncer de glândula adrenal, câncer de células escamosas, mesotelioma, osteocarcinoma, timoma/carcinoma do timo, glioblastoma, síndrome mielodisplásica, sarcoma dos tecidos moles, DIPG, adenocarcinoma, osteossarcoma, condrossarcoma, leucemia ou câncer pancreático. Em algumas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento inclui um carcinoma (por exemplo, um adenocarcinoma), linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma ou leucemia.

[0205] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é câncer de célula escamosa, câncer do pulmão de células pequenas, câncer do pulmão de células não pequenas, câncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, câncer pancreático, glioblastoma, glioma, câncer do colo do útero, câncer de ovário, câncer de fígado (por exemplo, carcinoma hepático e hepatoma), câncer de bexiga, câncer de mama, carcinoma de células de Merkel, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer de estômago, câncer de bexiga urinária, carcinoma endometrial, mieloma múltiplo), glândula salivar, carcinoma, câncer renal (por exemplo, carcinoma de células renais e tumores de Wilms), carcinoma basocelular, melanoma, câncer de próstata, câncer vulvar, câncer de tireoide, câncer testicular, câncer esofágico, adenocarcinoma seroso ou vários tipos de câncer de cabeça e pescoço. Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento inclui melanoma desmoplásico, câncer da mama inflamatório, timoma, câncer retal, câncer anal ou glioma do tronco cerebral tratável cirurgicamente ou não cirurgicamente tratável. Em uma modalidade específica, o câncer é um tumor sólido. Em outra modalidade específica, o câncer é glioblastoma multiforme. Em algumas modalidades, o glioblastoma multiforme é recorrente. Em algumas modalidades, o glioblastoma multiforme é diagnosticado recentemente. Em algumas modalidades, o glioblastoma multiforme está em um indivíduo que tem promotores MGMT não metilados. Em algumas modalidades, o glioblastoma multiforme é refratário à terapia com Bevacizumab. Em algumas modalidades, o glioblastoma multiforme está em um indivíduo que não recebeu a terapia com Bevacizumab.

[0206] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é o melanoma metastático (por exemplo, melanoma metastático resistente), câncer do ovário metastático ou carcinoma de células renais metastático. Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no

presente documento é o melanoma que é resistente a Ipilimumab. Em algumas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é o melanoma que é resistente a Nivolumab ou Pembrolizumab. Em algumas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é o melanoma que é resistente a Ipilimumab e Nivolumab ou Pembrolizumab.

[0207] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é câncer de mama (por exemplo, câncer de mama resistente a herceptin e trastuzumabe DM-1 (T-DM1) resistente ao câncer de mama), câncer de próstata, glioblastoma multiforme, colorretal câncer, sarcoma, câncer de bexiga, câncer do colo do útero, cânceres associados ao HPV, câncer da vagina, câncer de vulva, câncer de pênis, câncer de ânus, câncer de reto, câncer de orofaringe carcinoma, câncer dos ovários, câncer hepatocelular, câncer do endométrio, câncer pancreático, linfoma e leucemia (por exemplo, leucemia idosa, leucemia mieloide aguda (AML) e AML idosa).

[0208] Em certas modalidades, o câncer tratado de acordo com os métodos descritos no presente documento é melanoma maligno metastático (por exemplo, melanoma cutâneo ou maligno intraocular), câncer renal (por exemplo, carcinoma de células claras), câncer de próstata (por exemplo, adenocarcinoma de próstata hormônio refratário), câncer de mama, câncer de cólon, câncer de pulmão (por exemplo, câncer pulmonar de células não pequenas), câncer ósseo, câncer pancreático, câncer de pele, câncer de cabeça ou pescoço, câncer uterino, câncer de ovário, câncer retal, câncer de anal região, câncer de estômago, câncer testicular, câncer uterino, carcinoma das tubas uterinas, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma da vagina, carcinoma da vulva, câncer de esôfago, câncer de intestino delgado, câncer de o sistema endócrino, câncer da glândula tireoide, câncer da glândula paratireoide, câncer da glândula adrenal, sarcoma dos tecidos moles, câncer da uretra, câncer do pênis, leucemia crônica ou aguda,

incluindo mieloide aguda leucemia, leucemia mieloide crônica, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crônica, tumores sólidos da infância, linfoma linfocítico, câncer de bexiga, câncer de rim ou ureter, carcinoma da pelve renal, neoplasia do sistema nervoso central (SNC), linfoma primário do SNC, angiogênese tumoral, tumor no eixo espinhal, glioma do tronco encefálico, glioma, adenoma hipofisário, sarcoma de Kaposi, câncer epidermoide, câncer de células escamosas, linfoma de células T, cânceres induzidos ambientalmente incluindo aqueles induzidos por amianto, câncer de esôfago, câncer de fígado, malignidades refratárias ou recorrentes, cânceres metastáticos, cânceres que expressam PD-L1 e combinações dos ditos cânceres.

[0209] Em certas modalidades, o indivíduo recebeu anteriormente uma imunoterapia. Em certas modalidades, o indivíduo não recebeu anteriormente qualquer imunoterapia. Em certas modalidades, o câncer é um câncer avançado ou metastático.

[0210] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um método para prevenir ou tratar uma doença infecciosa em um indivíduo, em que o método compreende a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CTLA-4 ou uma composição farmacêutica do mesmo, conforme descrito no presente documento. Em uma modalidade, são fornecidos no presente documentos métodos para prevenir e/ou tratar uma infecção (por exemplo, uma infecção viral, uma infecção bacteriana, uma infecção fúngica, uma infecção por protozoários ou uma infecção parasitária). A infecção prevenida e/ou tratada de acordo com os modos pode ser causada por um agente infeccioso no presente documento identificado. Em uma modalidade específica, um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento ou uma composição farmacêutica do mesmo é o único agente ativo administrado a um indivíduo. Em algumas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento ou uma composição do mesmo é utilizado em combinação com intervenções anti-infecciosas (por

exemplo, antivirais, antibacterianos, antifúngicos ou anti-helmínticos) para o tratamento de doenças infecciosas.

[0211] As doenças infecciosas que podem ser tratadas e/ou prevenidas por anticorpos anti-CTLA-4 ou composições farmacêuticas descritas no presente documento são causadas por agentes infecciosos incluindo, mas não se limitando a, bactérias, parasitas, fungos, protozoários e vírus. Em uma modalidade específica, a doença infecciosa tratada e/ou prevenida por anticorpos anti-CTLA-4 ou composições farmacêuticas descritas no presente documento causadas por um vírus, doenças virais ou infecções virais que podem ser prevenidas e/ou tratadas de acordo com os métodos descritos no presente documento incluem, mas não estão limitadas a, causadas por hepatite do tipo A, hepatite do tipo B, hepatite C, influenza (por exemplo, influenza A ou influenza B), varicela, adenovírus, herpes simplex tipo I (HSV-I), herpes simplex tipo II (HSV-II), peste bovina, rinovírus, ecovírus, rotavírus, vírus sincicial respiratório, vírus do papiloma, vírus papova, citomegalovírus, echinovírus, arbovirus, huntavirus, vírus coxsackie, vírus da caxumba, vírus do sarampo, vírus da rubéola, poliovírus, varíola, vírus Epstein-Barr, vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-I), vírus da imunodeficiência humana tipo II (HIV-II) e agentes de doenças virais, como meningite viral, encefalite, dengue ou varíola.

[0212] As infecções bacterianas que podem ser prevenidas e/ou tratadas incluem infecções causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* e *Pseudomonas aeruginosa*. As doenças bacterianas causadas por bactérias (por exemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus viridans* e *Pseudomonas aeruginosa*) que podem ser prevenidas e/ou tratadas de acordo com os métodos descritos no presente documento incluem, mas não são limitados a, *Mycobacteria rickettsia*, *Mycoplasma*, *Neisseria*, *S. pneumonia*, *Borrelia burgdorferi* (doença de Lyme),

Bacillus antracis (anthrax), tétano, Streptococcus, Staphylococcus, mycobacterium, pertissus, cólera, peste, difteria, clamídia, S. aureus e legionella.

[0213] Doenças causadas por protozoários ou infecções por protozoários causadas por protozoários que podem ser prevenidos e/ou tratados de acordo com os métodos descritos no presente documento incluem, mas não estão limitados a, leishmania, coccidiose, esquistossomo de tripanossoma ou malária. Doenças parasitárias ou infecções parasitárias causadas por parasitas que podem ser prevenidos e/ou tratados de acordo com os métodos descritos no presente documento incluem, mas não se limitam a, clamídia e rickettsia.

[0214] As doenças fúngicas ou infecções fúngicas que podem ser prevenidas e/ou tratadas de acordo com os métodos descritos no presente documento incluem, mas não estão limitadas àquelas causadas por infecções por Candida, zigomicose, mastite por Candida, tricosporonose disseminada progressiva com tricosporonemia latente, disseminada candidíase, paracoccidioidomicose pulmonar, aspergilose pulmonar, pneumonia por Pneumocystis carinii, meningite criptocócica, meningoencefalite coccidioidal e vasculite cerebroespinal, infecção por Aspergillus niger, ceratite por Fusarium, micoses do seio paranasal, endocardite por Aspergillus fumigatus, discondroplasia tibial, vaginite por Candida glabrata, candidíase orofaríngea, crônico ligado ao cromossomo X doença granulomatosa, tinea pedis, candidíase cutânea, placentite micótica, tricosporona disseminada, aspergilose broncopulmonar alérgica, ceratite micótica, infecção por Cryptococcus neoformans, peritonite fúngica, infecção por Curvularia geniculata, endoftalmia estafilocócica, esporotricose e dermatofitose.

[0215] Em certas modalidades, a doença infecciosa é aguda. Em certas modalidades, a doença infecciosa é crônica. Em certas modalidades, a doença infecciosa é causada por flavivírus, por exemplo, vírus do Nilo Ocidental, vírus da encefalite de Saint Louis, vírus Powassan, vírus da

encefalite transmitida por carrapatos, vírus da dengue, zika vírus, vírus da doença de Kyasanur Forest, vírus da febre amarela e vírus chikungunya.. Em certas modalidades, a doença infecciosa é causada pelo vírus Ebola. Em certas modalidades, a doença infecciosa é causada pelo vírus da gripe. Em certas modalidades, a doença infecciosa é causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), vírus da Hepatite B (VHB) ou Vírus da Hepatite C (VHC). Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica do mesmo, conforme descrito no presente documento, promove o controle viral. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica do mesmo, conforme descrito no presente documento, elimina reservatórios virais.

[0216] A presente invenção se refere em um aspecto a um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e/ou uma composição farmacêutica da invenção que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e um carreador ou excipiente farmaceuticamente aceitável, para usar como um medicamento.

[0217] A presente invenção se refere, em um aspecto, a um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e/ou seu uso em combinação com carreadores ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis, para preparar composições farmacêuticas ou medicamentos para imunoterapia (por exemplo, um imunoterapia para aumentar a ativação de células T em resposta a um antígeno em um indivíduo, tratamento de câncer ou tratamento ou prevenção de doenças infecciosas).

[0218] A presente invenção se refere em um aspecto a um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e/ou uma composição farmacêutica da invenção que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e um carreador ou excipiente farmaceuticamente aceitável, para usar em um método para o tratamento do câncer.

[0219] A presente invenção se refere em um aspecto a um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e/ou uma composição farmacêutica da

invenção que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável, para utilizar em um método para inibir a tolerância do sistema imune a tumores e/ou para imunoterapia para indivíduos com câncer.

[0220] A presente invenção se refere em um aspecto a um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e/ou uma composição farmacêutica da invenção que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e um carreador ou excipiente farmacêuticamente aceitável, para usar em um método para o tratamento de uma doença infecciosa.

[0221] Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrada como uma monoterapia.

[0222] Em certas modalidades, estes métodos compreendem ainda a administração de um agente terapêutico adicional para o indivíduo. Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional é um agente quimioterápico ou de direcionamento de ponto de verificação. Em certas modalidades, o agente de direcionamento de ponto de verificação é selecionado do grupo que consiste em um anticorpo antagonista anti-PD-1, um anticorpo antagonista anti-PD-L1, um anticorpo antagonista anti-PD-L2, um anticorpo antagonista anti-CTLA-4, um anticorpo antagonista anti-TIM-3, um anticorpo antagonista anti-LAG-3, um anticorpo antagonista anti-CEACAM 1, um anticorpo agonista anti-GITR, um anticorpo agonista anti-OX40, um anticorpo agonista anti-CD 137, um anticorpo agonista anti-DR3, um anticorpo agonista anti-TNFSF 14 e um anticorpo agonista anti-CD27. Em certas modalidades, o agente de direcionamento de ponto de verificação é um anticorpo antagonista anti-PD-1. Em certas modalidades, o agente de direcionamento de ponto de verificação é um anticorpo antagonista anti-PD-L1. Em certas modalidades, o agente de direcionamento de ponto de verificação é um anticorpo antagonista anti-LAG-3. Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional é um agonista para um membro da superfamília do

receptor do fator de necrose tumoral ou um membro da superfamília do fator de necrose tumoral.

[0223] Em certas modalidades, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e/ou uma composição farmacêutica da invenção que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e um carreador farmaceuticamente aceitável ou excipiente e (b) um agente terapêutico adicional, para utilização como medicamento. Em uma modalidade preferencial, o agente terapêutico adicional é um agente quimioterápico ou de direcionamento para pontos de verificação.

[0224] Em certas modalidades, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e/ou uma composição farmacêutica da invenção que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e um carreador farmaceuticamente aceitável ou excipiente e (b) um agente terapêutico adicional, para utilização em um método para o tratamento de câncer.

[0225] Em certas modalidades, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e/ou uma composição farmacêutica da invenção que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e um carreador farmaceuticamente aceitável ou excipiente e (b) um agente terapêutico adicional, para utilização em um método para o tratamento de uma doença infecciosa.

[0226] Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente é administrado a um indivíduo em combinação com um composto que tem como alvo uma enzima (ou enzimas) imunomoduladora como IDO (indoleamina(2,3)-dioxigenase) e/ou TDO (triptofano(2,3)-dioxigenase). Em certas modalidades, tal composto é selecionado do grupo que consiste em epacadostatato (Incyte Corp; consulte, por exemplo, o documento WO 2010/005958 que está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade), F001287 (Flexus Biosciences), indoximod (NewLink Genetics), e NLG919 (NewLink Genetics). Em uma

modalidade, o composto é epacadostato. Em outra modalidade, o composto é F001287. Em outra modalidade, o composto é indoximod. Em outra modalidade, o composto é NLG919.

[0227] Em certas modalidades, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e/ou uma composição farmacêutica da invenção que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e um carreador farmaceuticamente aceitável ou excipiente e (b) um composto que tem como alvo uma enzima imunomoduladora, para utilização como medicamento. Em uma modalidade preferencial, o composto tem como alvo IDO e/ou TDO.

[0228] Em certas modalidades, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e/ou uma composição farmacêutica da invenção que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e um carreador farmaceuticamente aceitável ou excipiente e (b) um composto que tem como alvo uma enzima imunomoduladora, para utilização em um método para o tratamento de câncer. Em uma modalidade preferencial, o composto tem como alvo IDO e/ou TDO.

[0229] Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente é administrado a um indivíduo em combinação com uma vacina. Em certas modalidades, a vacina é uma vacina contra tumor à base de proteína de choque térmico ou uma vacina de patógeno à base de proteína de choque térmico. Em uma modalidade específica, um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento administrado a um indivíduo em combinação com uma vacina contra o tumor baseada na proteína de choque térmico. As proteínas de choque térmico (HSPs) são uma família de proteínas altamente conservadas encontradas em todas as espécies. Sua expressão pode ser fortemente induzida a níveis muito mais altos como resultado de choque térmico ou outras formas de estresse, incluindo exposição a toxinas, estresse oxidativo ou privação de glicose. Cinco famílias foram classificadas de acordo com o peso molecular: HSP-110, -90, -70, -60 e -28. As HSPs fornecem

peptídeos imunogênicos através da via de apresentação cruzada em células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas (DCs), levando à ativação de células T. As HSPs funcionam como portadores acompanhantes de peptídeos antigênicos associados a tumores, formando complexos com capacidade de induzir imunidade específica para tumores. Após a liberação das células tumorais moribundas, os complexos de antígenos HSP são absorvidos pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) em que os antígenos são processados em peptídeos que se ligam a moléculas MHC classe I e classe II levando à ativação de Células T CD8+ e CD4+ antitumorais. A imunidade provocada pelos complexos de HSP derivados de preparações de tumor é especificamente dirigida contra o repertório de peptídeo antigênico único expresso pelo câncer de cada indivíduo.

[0230] Um complexo de peptídeo de proteína de choque térmico (HSPPC) é um complexo de peptídeo de proteína que consiste em uma proteína de choque térmico não covalentemente complexada com peptídeos antigênicos. Os HSPPCs provocam respostas imunes inatas e adaptativas. Em uma modalidade específica, o peptídeo (ou peptídeos) antigênico apresenta antigenicidade para o câncer a ser tratado. Os HSPPCs são eficientemente apreendidos por APCs via receptores de membrana (principalmente CD91) ou por ligação a receptores Toll-like. A internalização de HSPPC resulta na maturação funcional das APCs com produção de quimiocinas e citocinas levando à ativação de células natural killer (NK), monócitos e respostas imunes mediadas por Th-1 e Th-2. Em certas modalidades, os HSPPCs utilizados nos métodos descritos no presente documento compreendem uma ou mais proteínas de choque térmico da família hsp60, hsp70 ou hsp90 de proteínas de estresse complexadas com peptídeos antigênicos. Em certas modalidades, os HSPPCs compreendem hsc70, hsp70, hsp90, hsp110, grp170, gp96, calreticulina ou combinações de dois ou mais dos mesmos.

[0231] Em uma modalidade específica, um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento é administrado a um indivíduo em

combinação com um complexo de peptídeo de proteína de choque térmico (HSPPC), por exemplo, complexo peptídico de proteína de choque térmico-96 (HSPPC-96). para tratar o câncer. O HSPPC-96 compreende uma proteína de choque térmico (Hsp) de 96 kDa, gp96, complexada com peptídeos antigênicos. O HSPPC-96 é uma imunoterapia de câncer fabricada a partir do tumor de um indivíduo e contém a “impressão digital” antigênica do câncer. Em certas modalidades, essa impressão digital contém antígenos únicos que estão presentes apenas nas células cancerosas específicas desse indivíduo e a injeção da vacina destina-se a estimular o sistema imune do indivíduo a reconhecer e atacar quaisquer células com a impressão digital específica do câncer.

[0232] Em certas modalidades, o HSPPC, por exemplo, HSPPC-96, é produzido a partir do tecido do tumor de um indivíduo. Em uma modalidade específica, o HSPPC (por exemplo, HSPPC-96) é produzido a partir de um tumor do tipo de câncer ou metástase do mesmo sendo tratado. Em uma outra modalidade específica, o HSPPC (por exemplo, HSPPC-96) é autólogo para o indivíduo a ser tratado. Em certas modalidades, o tecido tumoral é tecido tumoral não necrótico. Em certas modalidades, pelo menos 1 grama (por exemplo, pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, ou pelo menos 10 gramas) de tecido tumoral não necrótico é utilizado para produzir um regime de vacina. Em certas modalidades, após a ressecção cirúrgica, o tecido tumoral não necrótico é congelado antes da utilização na preparação da vacina. Em algumas modalidades, o HSPPC, por exemplo, HSPPC-96, é isolado do tecido tumoral por técnicas de purificação, filtrado e preparado para uma vacina injetável. Em certas modalidades, a um indivíduo são administradas 6-12 doses do HSPPC, por exemplo, HSPPC-96. Em tais modalidades, as doses de HSPPC, por exemplo, HSPPC-96, podem ser administradas semanalmente durante as primeiras 4 doses e depois quinzenalmente para as 2-8 doses adicionais.

[0233] Outros exemplos de HSPPCs que podem ser usados de acordo com os métodos descritos no presente documento são divulgados nas seguintes patentes e pedidos de patente, que estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade, Patentes n° US 6.391.306, 6.383.492, 6.403.095, 6.410.026, 6.436.404, 6.447.780, 6.447.781 e 6.610.659, todos incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0234] Em certas modalidades, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e/ou uma composição farmacêutica da invenção que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e um carreador farmacêuticamente aceitável ou excipiente e (b) uma vacina, para utilização como medicamento. Em uma modalidade preferencial, a vacina é uma vacina contra o tumor baseada em proteína de choque térmico ou uma vacina de patógeno à base de proteína de choque térmico. Em uma modalidade preferencial, a vacina é uma vacina viral baseada na proteína de choque térmico.

[0235] Em certas modalidades, a presente invenção se refere a (a) um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e/ou uma composição farmacêutica da invenção que compreende um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção e um carreador farmacêuticamente aceitável ou excipiente e (b) uma vacina, para utilização em um método para o tratamento de câncer. Em uma modalidade preferencial, a vacina é uma vacina contra tumores à base de proteína de choque térmico.

[0236] O anticorpo anti-CTLA-4 e o agente terapêutico adicional (por exemplo, quimioterápico, agente de direcionamento de ponto de verificação, inibidor de IDO e/ou vacina) podem ser administrados separada, sequencial ou concorrentemente como formas de dosagem separadas. Em uma modalidade, um anticorpo anti-CTLA-4 é administrado parentericamente e um inibidor de IDO é administrado oralmente.

[0237] Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente é administrado a um indivíduo intratumoralmente. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento é administrado a um indivíduo intratumoralmente em combinação com um agente terapêutico adicional. Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional é administrado sistemicamente. Em certas modalidades, o indivíduo tem tumores sólidos. Em certas modalidades, o indivíduo tem carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC). Em certas modalidades, o indivíduo tem câncer da mama HER2+. Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional que é administrado sistemicamente é um anticorpo anti-PD-1 (por exemplo, pembrolizumab ou nivolumab). Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional que é administrado sistemicamente é um anticorpo anti-EGFR (por exemplo, cetuximab). Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional que é administrado sistemicamente é um anticorpo anti-HER2 (por exemplo, trastuzumab). Em certas modalidades, o agente terapêutico adicional que é administrado sistemicamente é um agente quimioterápico (por exemplo, gemcitabina). Em certas modalidades, o indivíduo tem tumores sólidos e o agente terapêutico adicional que é administrado sistemicamente é um anticorpo anti-PD-1 (por exemplo, pembrolizumab ou nivolumab). Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é pembrolizumab administrado a 200 mg a cada três semanas. Em certas modalidades, o indivíduo tem carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (HNSCC) e o agente terapêutico adicional que é administrado sistemicamente é um anticorpo anti-EGFR (por exemplo, cetuximab). Em certas modalidades, o indivíduo tem câncer da mama HER2+ e o agente terapêutico adicional que é administrado sistemicamente é um anticorpo anti-HER2 (por exemplo, trastuzumab). Em certas modalidades, o indivíduo recebeu ainda um agente quimioterápico (por exemplo, gemcitabina). Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo anti-CTLA-4 e/ou composição farmacêutica da presente invenção e, opcionalmente, um agente terapêutico adicional, para

utilização em um método para o tratamento de câncer, em que o anti-CTLA-4 anticorpo e/ou composição farmacêutica da presente invenção é administrado intratumoralmente ao indivíduo. Em uma modalidade preferencial, um agente terapêutico adicional administrado ao indivíduo, com mais preferência, um agente terapêutico adicional administrado sistemicamente ao indivíduo.

[0238] Em certas modalidades, um anticorpo anti-PD-1 é usado em métodos descritos no presente documento. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é o Nivolumab, também conhecido como BMS-936558 ou MDX1106, desenvolvido pela Bristol-Myers Squibb. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é o Pembrolizumab, também conhecido como Lambrolizumab ou MK-3475, desenvolvido pela Merck & Co. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é Pidilizumab, também conhecido como CT-011, desenvolvido pela CureTech. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é o MEDI0680, também conhecido como AMP-514, desenvolvido pela Medimmune. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é PDR001 desenvolvido pela Novartis Pharmaceuticals. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é o REGN2810 desenvolvido pela Regeneron Pharmaceuticals. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é PF-06801591 desenvolvido pela Pfizer. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é BGB-A317 desenvolvido por BeiGene. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é TSR-042 desenvolvido por AnaptysBio e Tesaro. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-1 é SHR-1210 desenvolvido por Hengrui.

[0239] Outros exemplos não limitativos de anticorpos anti-PD-1 que podem ser usados em métodos de tratamento descritos no presente documento são divulgados nas seguintes patentes e pedidos de patente, que estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade para todos os fins: 6.808.710; Patente nº US 7.332.582; Patente nº US 7.488.802; Patente nº US 8.008.449; Patente nº US 8.114.845; Patente nº US 8.168.757; Patente nº US 8.354.509; Patente nº US 8.686.119;

Patente nº US 8.735.553; Patente nº US 8.747.847; Patente nº US 8.779.105; Patente nº US 8.927.697; Patente nº US 8.993.731; Patente nº US 9.102.727; Patente nº US 9.205.148; Publicação nº US 2013/0202623 A1; Publicação nº US 2013/0291136 A1; Patente nº US 2014/0044738 A1; Publicação nº US 2014/0356363 A1; Publicação nº US 2016/0075783 A1; e publicação nº PCT WO 2013/033091 A1; Publicação nº PCT WO 2015/036394 A1; Publicação nº PCT WO 2014/179664 A2; Publicação nº PCT WO 2014/209804 A1; Publicação nº PCT WO 2014/206107 A1; Publicação nº PCT WO 2015/058573 A1; Publicação nº PCT WO 2015/085847 A1; Publicação nº PCT WO 2015/200119 A1; Publicação nº PCT WO 2016/015685 A1; e Publicação nº PCT WO 2016/020856 A1.

[0240] Em certas modalidades, um anticorpo anti-PD-L1 é usado em métodos descritos no presente documento. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 é o atezolizumab desenvolvido pela Genentech. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 é o durvalumab desenvolvido pela AstraZeneca, Celgene e Medimmune. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 é avelumab, também conhecido como MSB0010718C, desenvolvido pela Merck Serono e pela Pfizer. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 é MDX-1105 desenvolvido pela Bristol-Myers Squibb. Em certas modalidades, o anticorpo anti-PD-L1 é AMP-224 desenvolvido por Amplimmune e GSK.

[0241] Exemplos não limitativos de anticorpos anti-PD-L1 que podem ser usados em métodos de tratamento descritos no presente documento são divulgados nas seguintes patentes e pedidos de patente, que estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade para todos os propósitos: Patente nº US 7.943.743; Patente nº US 8.168.179; Patente nº US 8.217.149; Patente nº US 8.552, 154; Patente nº US 8.779.108; Patente nº US 8.981.063; Patente nº US 9.175.082; Publicação nº US 2010/0203056 A1; Publicação nº US 2003/0232323 A1; Publicação nº US 2013/0323249 A1; Publicação nº US 2014/0341917 A1; Patente nº US

2014/0044738 A1; Publicação nº US 2015/0203580 A1; Publicação nº US 2015/0225483 A1; Publicação nº US 2015/0346208 A1; Publicação nº US 2015/0355184 A1; e Publicação nº PCT WO 2014/100079 A1; Publicação nº PCT WO 2014/022758 A1; Publicação nº PCT WO 2014/055897 A2; Publicação nº PCT WO 2015/061668 A1; Publicação nº PCT WO 2015/109124 A1; Publicação nº PCT WO 2015/195163 A1; Publicação nº PCT WO 2016/000619 A1; e Publicação nº PCT WO 2016/030350 A1.

[0242] Em certas modalidades, um anticorpo anti-LAG-3 é usado em métodos descritos no presente documento. Em certas modalidades, o anticorpo anti-LAG-3 é BMS-986016 desenvolvido por Bristol-Myers Squibb. Em certas modalidades, o anticorpo anti-LAG-3 é LAG525 desenvolvido pela Novartis. Em certas modalidades, o anticorpo anti-LAG-3 é GSK2831781 desenvolvido por GSK.

[0243] Exemplos não limitativos de anticorpos anti-LAG-3 que podem ser usados em métodos de tratamento descritos no presente documento são divulgados nas seguintes patentes e pedidos de patente, que são incorporados no presente documento a título de referência em sua totalidade para todos os propósitos: Patente nº US 9.244.059; Publicação nº US 2011/0150892 A1; Patente nº US 2014/0093511 A1; Publicação nº US 2014/0286935 A1; Publicação nº US 2015/0259420 A1; e Publicação nº PCT WO 2015/042246 A1; Publicação nº PCT WO 2015/116539 A1; Publicação nº PCT WO 2015/200119 A1; e Publicação nº PCT WO 2016/028672 A1.

[0244] Em certas modalidades, um anticorpo anti-EGFR é usado em métodos descritos no presente documento. Em certas modalidades, o anticorpo anti-EGFR é cetuximab desenvolvido por Bristol-Myers Squibb e ImClone, panitumumab desenvolvido por Abgenix e Amgen, nimotuzumab desenvolvido por CMI Cuba e YM Biosciences, necitumumab desenvolvido por ImClone, zalutumumab desenvolvido por Genmab, matuzumab desenvolvido por Takeda, Sym004 desenvolvido por Merck Serono e Symphogen, imgatuzumab desenvolvido por Glycart e Roche, duligotumab

desenvolvido por Genentech e Roche, depatuxizumab desenvolvido por Abbott, depatuxizumab mafodotin desenvolvido por Abbvie, MM-151 desenvolvido por Adimab e Merrimack, GC 1118 desenvolvido por Green Cross, AMG 595 desenvolvido pela Amgen e ImmunoGen, CetuGEX desenvolvido pela Glycotope, laprituximab emtansine desenvolvido pela ImmunoGen, JNJ-61186372 desenvolvido pela Genmab e Janssen Biotech, SCT200 desenvolvido pela Sinocelltech, LY3164530 desenvolvido pela Lilly, HLX07 desenvolvido pela Shanghai Henlius, ou SYN004 desenvolvido pela Synermore.

[0245] Em certas modalidades, um anticorpo anti-HER2 é usado em métodos descritos no presente documento. Em certas modalidades, o anticorpo anti-HER2 é trastuzumab desenvolvido pela Genentech e Roche, trastuzumab emtansina desenvolvido pela Genentech e Roche, pertuzumab desenvolvido pela Genentech, ertumaxomab desenvolvido pela Fresenius, margetuximab desenvolvido pela MacroGenics, MM-111 desenvolvido pela Merrimack, CT-P06 desenvolvido por Celltrion, PF-05280014 desenvolvido pela Pfizer, MM-302 desenvolvido pela Merrimack, SB3 desenvolvido pela Merck & Co, CMAB302 desenvolvido pela Shanghai CP Guojian, TrasGEX desenvolvido pela Glycotope, ARX788 desenvolvido pela Ambrx e Zhejiang Medicine, SYD985 desenvolvido pela Synthon, FS 102 desenvolvido pela Bristol-Myers Squibb e f-star, BCD-022 desenvolvido pela Biocad, ABP 980 desenvolvido pela Amgen, DS-8201a desenvolvido pela Daiichi Sankyo, HLX02 desenvolvido pela Shanghai Henlius, ou CANMAb desenvolvido pela Biocon e Mylan.

[0246] Um anticorpo ou composição farmacêutica descrita no presente documento pode ser entregue a um indivíduo por uma variedade de vias. Essas incluem, mas não estão limitados a, vias parentérica, intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, tópica, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, intravenosa, intratumoral, conjuntival e subcutânea. A administração pulmonar também pode ser utilizada, por

exemplo, pela utilização de um inalador ou nebulizador, e formulação com um agente de aerossol para utilização como aspersionador. Em certas modalidades, o anticorpo ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado por via subcutânea ou intravenosa. Em certas modalidades, o anticorpo ou composição farmacêutica descrito no presente documento é entregue intratumoralmente. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é entregue a um nódulo linfático de drenagem tumoral. Em certas modalidades, o anticorpo ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado através de uma administração localizada (por exemplo, administração subcutânea). Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é entregue sistemicamente. Em certas modalidades, o anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é fornecido localmente.

[0247] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo anti-CTLA-4 e/ou composição farmacêutica da presente invenção, e opcionalmente um agente terapêutico adicional, para utilização em um método para o tratamento de câncer, em que o anticorpo anti-CTLA-4 e/ou composição farmacêutica da presente invenção entregue intratumoralmente ao indivíduo, entregue a um nódulo linfático de drenagem tumoral de um indivíduo ou administrado através de uma administração localizada (por exemplo, administração subcutânea) a um indivíduo.

[0248] A quantidade de um anticorpo ou composição que será eficaz no tratamento e/ou prevenção de uma condição dependerá da natureza da doença e pode ser determinada por técnicas clínicas padrão.

[0249] A dose precisa a ser empregada em uma composição também dependerá da via de administração e da gravidade da infecção ou doença causada pela mesma, e deve ser decidida de acordo com o julgamento do profissional e as circunstâncias de cada indivíduo. Por exemplo, as doses eficazes também podem variar dependendo dos meios de

administração, sítio-alvo, estado fisiológico do paciente (incluindo idade, peso corporal e saúde), se o paciente é um ser humano ou animal, outros medicamentos administrados ou se o tratamento é profilático ou terapêutico. Normalmente, o paciente é um ser humano, mas mamíferos não humanos, incluindo mamíferos transgênicos, também podem ser tratados. As dosagens de tratamento são otimamente tituladas para otimizar a segurança e a eficácia.

[0250] Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente é administrado a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 1 mg/kg, cerca de 3 mg/kg, cerca de 6 mg/kg ou cerca de 10 mg/kg. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento administrado a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) toda semana, a cada duas semanas, a cada três semanas, a cada quatro semanas, a cada seis semanas, a cada oito semanas, a cada doze semanas, a cada mês, a cada dois meses, a cada três meses, a cada quatro meses, a cada cinco meses, a cada seis meses, a cada oito meses e a cada ano, por exemplo, nas doses descritas acima. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou uma composição farmacêutica descrita no presente documento é administrada a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a cada três semanas nas doses descritas acima.

[0251] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo anti-CTLA-4 e/ou composição farmacêutica da presente invenção, e opcionalmente um agente terapêutico adicional, para utilização em um método para o tratamento de câncer, em que o anticorpo anti-CTLA-4 e/ou composição farmacêutica da presente invenção administrado a um indivíduo a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, 10 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 1 mg/kg, cerca de 3 mg/kg, cerca de 6 mg/kg ou cerca de 10 mg/kg, com mais preferência cada

duas semanas, a cada três semanas, a cada quatro semanas, a cada seis semanas ou a cada doze semanas.

[0252] Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a 0,1 mg/kg a cada duas semanas, a cada três semanas, a cada quatro semanas, a cada seis semanas, a cada doze semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento administrado a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a 0,3 mg/kg a cada duas semanas, a cada três semanas, a cada quatro semanas, a cada seis semanas ou a cada doze semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento administrado a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a 1 mg/kg a cada duas semanas, a cada três semanas, a cada quatro semanas, a cada seis semanas ou a cada doze semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a 3 mg/kg a cada duas semanas, a cada três semanas, a cada quatro semanas, a cada seis semanas ou a cada doze semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a 6 mg/kg a cada duas semanas, a cada três semanas, a cada quatro semanas, a cada seis semanas ou a cada doze semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a 10 mg/kg a cada duas semanas, a cada três semanas, a cada quatro semanas, a cada seis semanas ou a cada doze semanas.

[0253] Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente é administrada a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a 0,1 mg/kg ou cerca de 0,1

mg/kg a cada três semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a 0,3 mg/kg ou cerca de 0,3 mg/kg a cada três semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a 1 mg/kg ou cerca de 1 mg/kg a cada três semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a 3 mg/kg ou cerca de 3 mg/kg a cada três semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a 6 mg/kg ou cerca de 6 mg/kg a cada três semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado a um indivíduo (por exemplo, via injeção intravenosa) a 10 mg/kg ou cerca de 10 mg/kg a cada três semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente é administrado a um indivíduo via injeção intratumoral a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 1 mg/kg, ou cerca de 3 mg/kg. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento administrado a um indivíduo via injeção intratumoral toda semana, a cada duas semanas, a cada três semanas, a cada quatro semanas, a cada seis semanas, a cada oito semanas, a cada doze semanas., a cada mês, a cada dois meses, a cada três meses, a cada quatro meses, a cada cinco meses, a cada seis meses, a cada oito meses e a cada ano, por exemplo, nas doses descritas acima. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou uma composição farmacêutica descrita no presente documento é administrada

a um indivíduo via injeção intratumoral a cada três semanas nas doses descritas acima.

[0254] Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente é administrado a um indivíduo via injeção intratumoral a 0,01 mg/kg ou cerca de 0,01 mg/kg a cada três semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado a um indivíduo através de injeção intratumoral a 0,03 mg/kg ou cerca de 0,03 mg/kg cada três semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrita no presente documento é administrado a um indivíduo por injeção intratumoral a 0,1 mg/kg ou cerca de 0,1 mg/kg cada três semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado a um indivíduo por injeção intratumoral a 0,3 mg/kg ou cerca de 0,3 mg/kg cada três semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado a um indivíduo por injeção intratumoral a 1 mg/kg ou cerca de 1 mg/kg de três em três semanas. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado a um indivíduo através de injeção intratumoral a 3 mg/kg ou cerca de 3 mg/kg a cada três semanas.

[0255] Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado a um indivíduo através de uma administração localizada (por exemplo, administração subcutânea) a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 1 mg/kg ou cerca de 3 mg/kg. Em certas modalidades, um anticorpo anti-CTLA-4 ou composição farmacêutica descrito no presente documento é administrado a um indivíduo através de uma administração localizada (por exemplo, administração subcutânea) todas as

semanas, a cada duas semanas, a cada três semanas, a cada quatro semanas, a cada seis semanas, a cada oito semanas, a cada doze semanas, a cada mês, a cada dois meses, a cada três meses, a cada quatro meses, a cada cinco meses, a cada seis meses, a cada oito meses e a cada ano, por exemplo, nas doses descritas acima.

[0256] Em certas modalidades, a combinação terapêutica é administrada a um indivíduo por pelo menos 3, 6, 9, 12, 18 ou 24 meses. Em certas modalidades, a combinação terapêutica é administrada a um indivíduo durante um período máximo de 3, 6, 9, 12, 18 ou 24 meses.

[0257] Em certas modalidades, a presente revelação fornece um método de tratamento de um indivíduo com angiossarcoma, em que o método compreende a administração ao indivíduo (por exemplo, por via intravenosa, intratumoral ou subcutânea) uma quantidade eficaz de um anticorpo anti-CTLA-4 ou farmacêutica composição descrita no presente documento. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um método para tratar um indivíduo com angiossarcoma, em que o método compreende administrar intravenosa a um indivíduo que se liga especificamente a CTLA-4 humano a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 1 mg/kg ou cerca de 3 mg/kg, opcionalmente a cada uma, duas ou três semanas. Em certas modalidades, a presente revelação fornece um método de tratamento de um indivíduo com angiossarcoma, em que o método compreende administrar ao indivíduo intravenosamente um anticorpo que se liga especificamente a CTLA-4 humano a 0,1 mg/kg uma vez a cada três semanas. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma região variável da cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 8 e uma região variável da cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 9. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 23; e uma cadeia leve que compreende a

sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 24; e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25; e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27. Em certas modalidades, o anticorpo compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26; e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27.

[0258] Um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento também pode ser usado para testar os níveis de proteína CTLA-4 em uma amostra biológica usando métodos imuno-histológicos clássicos conhecidos pelos versados na técnica, incluindo imunoensaios, como o ensaio imunoenzimático (ELISA), imunoprecipitação ou Western blotting. Os marcadores de ensaio de anticorpo adequados são conhecidos na técnica e incluem marcadores de enzima, como glucose oxidase; radioisótopos, como iodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), enxofre (^{35}S), trítio (^3H), índio (^{121}In) e tecnécio (^{99}Tc); marcadores luminescentes, como luminol; e marcadores fluorescentes, como fluoresceína e rodamina e biotina. Tais marcadores podem ser usados para marcar um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento. Alternativamente, um segundo anticorpo que reconhece um anticorpo anti-CTLA-4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento pode ser marcado e usado em combinação com um anticorpo anti-CTLA-4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo para detectar níveis de proteína CTLA-4. Em uma modalidade, a presente invenção se refere à utilização de um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção, para ensaiar e/ou detectar os níveis de proteína CTLA-4 em uma amostra biológica *in vitro*.

[0259] O ensaio para o nível de expressão da proteína CTLA-4 pretende incluir, qualitativa ou quantitativamente, a medição ou estimativa do nível de uma proteína CTLA-4 em uma primeira amostra biológica, quer diretamente (por exemplo, determinando ou estimando o nível de proteína absoluto) ou relativamente (por exemplo, comparando com o nível de proteína associada à doença em uma segunda amostra biológica). O nível de expressão do polipeptídeo CTLA-4 na primeira amostra biológica pode ser medido ou estimado e comparado com um nível de proteína CTLA-4 padrão, em que o padrão é retirado de uma segunda amostra biológica obtida de um indivíduo que não tem o distúrbio ou que é determinado por níveis médios de uma população de indivíduos que não têm o distúrbio. Como será apreciado na técnica, uma vez que o nível “padrão” de polipeptídeo de CTLA-4 é conhecido, isso pode ser utilizado repetidamente como padrão para comparação.

[0260] Conforme usado no presente documento, o termo “amostra biológica” se refere a qualquer amostra biológica obtida a partir de um indivíduo, linha celular, tecido ou outra fonte de células que expressem potencialmente CTLA-4. Métodos para obter biópsias de tecidos e fluidos corporais de animais (por exemplo, seres humanos) são bem conhecidos na técnica. Amostras biológicas incluem células sanguíneas mononucleares periféricas.

[0261] Um anticorpo anti-CTLA-4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento pode ser usado para prognóstico, diagnóstico, monitoramento e triagem aplicações, incluindo aplicações in vitro e in vivo bem conhecidas e padrão para o versado e com base na presente revelação. Testes e kits de prognóstico, diagnóstico, monitorização e rastreio para avaliação in vitro e avaliação do estado do sistema imune e/ou resposta imune podem ser usados para prever, diagnosticar e monitorar para avaliar amostras de doentes incluindo aquelas que se suspeita ter ou ter um disfunção de sistema imune ou em relação a uma resposta antecipada ou desejada do sistema imune, resposta antigênica ou

resposta à vacina. A análise e a avaliação do estado do sistema imune e/ou resposta imune também é útil na determinação da adequabilidade de um doente para um ensaio clínico de um fármaco ou para a administração de um agente quimioterápico particular ou um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, incluindo combinações dos mesmos, versus um agente ou anticorpo diferente ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Esse tipo de monitorização e avaliação prognóstica e diagnóstica já está na prática utilizando anticorpos contra a proteína HER2 no câncer de mama (HercepTest™, Dako), onde o ensaio também é usado para avaliar pacientes para terapia com anticorpos usando Herceptin®. As aplicações in vivo incluem terapia celular dirigida e modulação do sistema imunológico e imagem de rádio de respostas imunes.

[0262] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo anti-CTLA-4 e/ou composição farmacêutica da presente invenção para utilização como um diagnóstico.

[0263] Em um aspecto, a presente invenção se refere a um anticorpo anti-CTLA-4 e/ou composição farmacêutica da presente invenção para utilização em um método para a previsão, diagnóstico e/ou monitoramento de uma disfunção do sistema imunológico e/ou câncer.

[0264] Em uma modalidade, a presente invenção se refere à utilização de um anticorpo anti-CTLA-4 da invenção, para prever, diagnosticar e/ou monitorar um sistema imunológico, disfunção e/ou câncer em um indivíduo por ensaio e/ou detectar níveis de proteína CTLA-4 em uma amostra biológica do indivíduo de in vitro.

[0265] Em uma modalidade, um anticorpo anti-CTLA-4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser usado em imuno-histoquímica de amostras de biópsia. Em outra modalidade, um anticorpo anti-CTLA-4 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ser utilizado para detectar níveis de CTLA-4, ou níveis de células que contêm CTLA-4 na sua superfície de membrana, cujos níveis podem ser ligados a certos sintomas

da doença. Anticorpos anti-CTLA-4 ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento podem conter um marcador detectável ou funcional. Quando são usados marcadores de fluorescência, podem ser usados anise de classificação de células e microscopia ativada por fluorescência (FACS) ou combinação de ambos os processos de procedimentos conhecidos na técnica para identificar e quantificar os membros de ligação específica. Anticorpos anti-CTLA-4 ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento podem conter um marcador de fluorescência. Os marcadores de fluorescência exemplificativos incluem, por exemplo, sondas reativas e conjugadas, por exemplo, Aminocumarina, Fluoresceína e Vermelho do Texas, corantes Alexa Fluor, corantes Cy e corantes DyLight. Um anticorpo anti-CTLA-4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo pode ter um marcador radioativo, como os isótopos ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{117}Lu , ^{121}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{198}Au , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac e ^{186}Re . Quando são usados marcadores radioativos, podem ser usados procedimentos de contagem atualmente conhecidos na técnica para identificar e quantificar a ligação específica do anticorpo anti-CTLA-4 ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano). No caso em que o marcador é uma enzima, a detecção pode ser realizada por qualquer uma das técnicas colorimétricas, espectrofotométricas, fluorospectrofotométricas, amperométricas ou gasométricas utilizadas atualmente, como é conhecido na técnica. Isso pode ser conseguido pondo em contacto uma amostra ou uma amostra de controle com um anticorpo anti-CTLA-4 ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo sob condições que permitam a formação de um complexo entre o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e CTLA-4. Quaisquer complexos formados entre o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e o CTLA-4 são detectados e comparados na amostra e no controle. À luz da ligação específica dos anticorpos descritos no presente documento para CTLA-4, os

anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos podem ser usados para detectar especificamente a expressão de CTLA-4 na superfície das células. Os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos descritos no presente documento também podem ser usados para purificar CTLA-4 por purificação por imunoafinidade. Também está no presente documento incluído um sistema de ensaio que pode ser preparado na forma de um kit de teste para a análise quantitativa da extensão da presença de, por exemplo, complexos de ligantes CTLA-4 ou CTLA-4/CTLA-4. O sistema ou kit de teste pode compreender um componente marcado, por exemplo, um anticorpo marcado, e um ou mais reagentes imunoquímicos adicionais.

[0266] Em uma modalidade, a presente invenção se refere a um método in vitro para ensaio e/ou detecção de níveis de proteína CTLA-4 em uma amostra biológica que compreende (1) contato com uma amostra e, opcionalmente, uma amostra de controle com um anti-CTLA-4 anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da invenção sob condições que permitem a formação de um complexo entre o anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo e CTLA-4, e (2) a detecção e comparação dos complexos formados na amostra e opcionalmente ao controle.

6.5 POLINUCLEOTÍDEOS, VETORES E MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ANTI-CTLA-4

Anticorpos

[0267] Em um outro aspecto, são fornecidos no presente documento polinucleotídeos que compreende uma sequência nucleotídica que codifica um anticorpo descrito no presente documento ou um fragmento do mesmo (por exemplo, uma região variável de cadeia leve e/ou região variável de cadeia pesada) que se liga especificamente a um CTLA-4 (por exemplo, antígeno CTLA-4 humano, e vetores, por exemplo, vetores que compreende tais polinucleotídeos para expressão recombinante em células hospedeiras (por exemplo, E. coli e células de mamíferos). São fornecidos no presente documento polinucleotídeos que compreendem sequências nucleotídicas que codificam qualquer um dos anticorpos fornecidos no presente documento, bem

como vetores que compreende tais sequências polinucleotídicas, por exemplo, vetores de expressão para a sua expressão eficiente em células hospedeiras, por exemplo, células de mamífero.

[0268] Conforme usado no presente documento, um polinucleotídeo “isolado” ou molécula de ácido nucleico é um que é separado de outras moléculas de ácido nucleico que estão presentes na fonte natural (por exemplo, em um camundongo ou em um ser humano) da molécula de ácido nucleico. Além disso, uma molécula de ácido nucleico “isolada”, como uma molécula de cDNA, pode estar substancialmente isenta de outro material celular, ou meio de cultura quando produzida por técnicas recombinantes, ou substancialmente isenta de precursores químicos ou outros químicos quando sintetizada quimicamente. Por exemplo, a expressão “substancialmente livre” inclui preparações de polinucleotídeo ou molécula de ácido nucleico com menos de cerca de 15%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% ou 0,1% (em particular menos de cerca de 10%) de outro material, por exemplo, material celular, meio de cultura, outras moléculas de ácido nucleico, precursores químicos e/ou outros produtos químicos. Em uma modalidade específica, uma molécula (ou moléculas) de ácido nucleico que codifica um anticorpo descrito no presente documento é isolada ou purificada.

[0269] Em aspectos particulares, são fornecidos no presente documento polinucleotídeos que compreendem sequências nucleotídicas codificando anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que se ligam especificamente a um polipeptídeo CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e compreendem uma sequência de aminoácidos conforme descrito no presente documento, bem como anticorpos que competem com tais anticorpos pela ligação a um polipeptídeo de CTLA-4 (por exemplo, de um modo dependente da dose), ou que se liga ao mesmo epítopo que o de tais anticorpos.

[0270] Em certos aspectos, são fornecidos no presente documento polinucleotídeos que compreendem uma sequência de

nucleotídeos que codifica a cadeia leve ou cadeia pesada de um anticorpo descrito no presente documento. Os polinucleotídeos podem compreender sequências nucleotídicas que codificam uma cadeia leve que compreende os FR e CDR de anticorpos descritos no presente documento (consulte, por exemplo, Tabela 1).

[0271] Também são fornecidos no presente documento polinucleotídeos que codificam um anticorpo anti-CTLA-4 que são otimizados, por exemplo, por otimização de códon/RNA, substituição com sequências sinal heterólogas e eliminação de elementos de instabilidade de mRNA. Métodos para gerar ácidos nucleicos otimizados que codificam um anticorpo anti-CTLA-4 ou um fragmento da mesma (por exemplo, cadeia leve, cadeia pesada, domínio VH ou domínio VL) para expressão recombinante por introdução de alterações de códon e/ou eliminação de regiões inibitórias no mRNA pode ser realizado adaptando os métodos de otimização descritos, por exemplo, nas Patentes nº US 5.965.726; 6.174.66; 6.291.664; 6.414.132; e 6.794.498, em conformidade, todos as quais estão incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Por exemplo, potenciais sítios de splice e elementos de instabilidade (por exemplo, elementos ricos em A/T ou AU) dentro do RNA podem ser mutados sem alterar os aminoácidos codificados pelas sequências de ácido nucleico para aumentar a estabilidade do RNA para expressão recombinante. As alterações utilizam a degenerescência do código genético, por exemplo, usando um códon alternativo para um aminoácido idêntico. Em algumas modalidades, pode ser desejável alterar um ou mais códons para codificar uma mutação conservativa, por exemplo, um aminoácido semelhante com estrutura e propriedades químicas semelhantes e/ou função como o aminoácido original. Tais métodos podem aumentar a expressão de um anticorpo anti-CTLA-4 ou um fragmento do mesmo em pelo menos 1 vez, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 10 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes, ou 100 vezes ou mais

relativamente em relação à expressão de um anticorpo anti-CTLA-4 codificado por polinucleotídeos que não foram otimizados.

[0272] Em certas modalidades, uma sequência polinucleotídica otimizada que codifica um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento ou um fragmento do mesmo (por exemplo, domínio VL e/ou domínio VH) pode hibridizar em um polinucleotídeo antissenso (por exemplo, complementar) de uma sequência polinucleotídica não otimizada que codifica um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento ou um fragmento do mesmo (por exemplo, domínio VL e/ou domínio VH). Em modalidades específicas, uma sequência nucleotídica otimizada que codifica um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento ou um fragmento hibridiza em condições de elevada severidade com polinucleotídeo antissenso de uma sequência polinucleotídica não otimizada que codifica um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento ou um fragmento do mesmo. Em uma modalidade específica, uma sequência nucleotídica otimizada que codifica um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento ou um fragmento do mesmo hibridiza sob condições de hibridização de severidade de severidade alta, intermediária ou inferior a um polinucleotídeo antissenso de uma sequência nucleotídica não otimizada que codifica um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento ou um fragmento do mesmo. As informações relativas às condições de hibridização foram descritas, consulte, por exemplo, a publicação do pedido de patente n° US 2005/0048549 (por exemplo, parágrafos 72-73), que está incorporado ao presente documento a título de referência.

[0273] Os polinucleotídeos podem ser obtidos e a sequência nucleotídica dos polinucleotídeos determinada por qualquer método conhecido na técnica. As sequências de nucleotídeos que codificam os anticorpos descritos no presente documento, por exemplo, anticorpos descritos na Tabela 1, e versões modificadas de tais anticorpos podem ser determinadas utilizando métodos bem conhecidos na técnica, isto é, códons nucleotídicos

conhecidos por codificar aminoácidos particulares são montados de forma a gerar um ácido nucleico que codifica o anticorpo. Tal polinucleotídeo que codifica o anticorpo pode ser montado a partir de oligonucleotídeos sintetizados quimicamente (por exemplo, conforme descrito em Kutmeier G et al, (1994), BioTechniques 17: 242-6, incorporado a título de referência em sua totalidade), que envolve a síntese de oligonucleotídeos sobreponíveis contendo porções da sequência que codificam o anticorpo, emparelhamento e ligação daqueles oligonucleotídeos e, depois, amplificação dos oligonucleotídeos ligados por PCR.

[0274] Alternativamente, um polinucleotídeo que codifica um anticorpo descrito no presente documento pode ser gerado a partir de ácido nucleico de uma fonte adequada (por exemplo, um hibridoma) utilizando métodos bem conhecidos na técnica (por exemplo, PCR e outros métodos de clonagem molecular). Por exemplo, a amplificação por PCR utilizando iniciadores sintéticos hibridizáveis com as extremidades 3' e 5' de uma sequência conhecida pode ser realizada utilizando DNA genômico obtido de células de hibridoma que produzem o anticorpo de interesse. Tais métodos de amplificação por PCR podem ser usados para obter ácidos nucleicos que compreendem a sequência que codifica a cadeia leve e/ou cadeia pesada de um anticorpo. Tais métodos de amplificação por PCR podem ser usados para obter ácidos nucleicos que compreendem a sequência que codifica a região variável da cadeia leve e/ou a região variável da cadeia pesada de um anticorpo. Os ácidos nucleicos amplificados podem ser clonados em vetores para expressão em células hospedeiras e para posterior clonagem, por exemplo, para gerar anticorpos quiméricos e humanizados.

[0275] Se um clone contendo um ácido nucleico que codifica um anticorpo particular não está disponível, mas a sequência da molécula de anticorpo é conhecida, um ácido nucleico que codifica a imunoglobulina pode ser quimicamente sintetizado ou obtido de uma fonte adequada (por exemplo, um biblioteca de cDNA de anticorpo ou biblioteca de

cDNA gerada a partir de, ou ácido nucleico, de preferência, poli A + RNA, isolado de qualquer tecido ou células que expressam o anticorpo, como células de hibridoma selecionadas para expressar um anticorpo descrito no presente documento) por amplificação por PCR utilizando primers sintéticos hibridizáveis em extremidades 3' e 5' da sequência ou por clonagem utilizando uma sonda oligonucleotídica específica para a sequência genética particular para identificar, por exemplo, um clone de cDNA de uma biblioteca de cDNA que codifica o anticorpo. Os ácidos nucleicos amplificados gerados por PCR podem então ser clonados em vetores de clonagem replicáveis utilizando qualquer método bem conhecido na técnica.

[0276] O DNA que codifica os anticorpos anti-CTLA-4 descritos no presente documento pode ser prontamente isolado e sequenciado usando procedimentos convencionais (por exemplo, usando sondas oligonucleotídicas que têm a capacidade de se ligar especificamente a genes que codificam as cadeias pesada e leve dos anticorpos anti-CTLA-4). As células de hibridoma podem servir como uma fonte desse DNA. Uma vez isolado, o DNA pode ser colocado em vetores de expressão, que são então transfectados em células hospedeiras, como as células de E. coli, células COS de símio, células de ovário de hamster chinês (CHO) (por exemplo, células CHO do CHO GS System™ (Lonza), ou células de mieloma que de outro modo não produzem proteína imunoglobulina, para obter a síntese de anticorpos anti-CTLA-4 nas células hospedeiras recombinantes.

[0277] Para gerar anticorpos inteiros, podem ser usados iniciadores de PCR incluindo sequências nucleotídicas VH ou VL, um sítio de restrição e uma sequência flanqueadora para proteger o sítio de restrição para amplificar as sequências VH ou VL em clones scFv. Utilizando técnicas de clonagem conhecidas pelos versados na técnica, os domínios VH amplificados por PCR podem ser clonados em vetores expressando uma região constante da cadeia pesada, por exemplo, a região constante gama 4 humana, e os domínios VL amplificados por PCR podem ser clonados em vetores

expressando uma região constante da cadeia leve, por exemplo, regiões constantes kappa ou lambda humanas. Em certas modalidades, os vetores para expressar os domínios VH ou VL compreendem um promotor EF-1 α , um sinal de secreção, um sítio de clonagem para a região variável, domínios constantes e um marcador de seleção como neomicina. Os domínios VH e VL também podem ser clonados em um vetor expressando as regiões constantes necessárias. Os vetores de conversão da cadeia pesada e os vetores de conversão da cadeia leve são então cotransfectados em linhas celulares para gerar linhas celulares estáveis ou transientes que expressam anticorpos de comprimento total, por exemplo, IgG, utilizando técnicas conhecidas pelos versados na técnica.

[0278] O DNA também pode ser modificado, por exemplo, substituindo a sequência de codificação por domínios constantes de cadeia pesada e leve humanos no lugar das sequências murinas, ou por união covalente à sequência de codificação da imunoglobulina toda ou parte da sequência de codificação para um polipeptídeo não imunoglobulina.

[0279] São também fornecidos polinucleotídeos que hibridizam sob condições de severidade elevada, intermediária ou severidade de polinucleotídeos que codificam um anticorpo descrito no presente documento. Em modalidades específicas, os polinucleotídeos descritos no presente documento hibridizam sob condições de hibridização de severidade de severidade alta, intermediária ou inferior a polinucleotídeos que codificam um domínio VH e/ou domínio VL fornecidos no presente documento.

[0280] As condições de hibridização foram descritas na técnica e são conhecidas por um versado na técnica. Por exemplo, a hibridização em condições rigorosas pode envolver a hibridização com DNA ligado ao filtro em 6x cloreto de sio/citrato de sio (SSC) a cerca de 45 seguido de uma ou mais lavagens em 0,2xSSC/SDS a 0,1% a cerca de 50-65 °C; hibridização sob condições altamente rigorosas podem envolver hibridização em ácido nucleico ligado ao filtro em 6xSSC a cerca de 45 °C seguido por uma

ou mais lavagens em 0,1xSSC/0,2% SDS a cerca de 68 °C. A hibridização sob outras condições de hibridização rigorosas os versados na técnica foram descritas, consulte, por exemplo, Ausubel FM et al, eds., (1989) Current Protocols in Molecular Biology, vol. 1, Green Publishing Associates, Inc. e John Wiley & Sons, Inc., Nova York, nas páginas 6.3.1-6.3.6 e 2.10.3, incorporadas a título de referência em sua totalidade.

[0281] Em certos aspectos, são fornecidas no presente documento células (por exemplo, células hospedeiras) expressando (por exemplo, recombinantemente) anticorpos descritos no presente documento (ou um fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos) que se ligam especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e polinucleotídeos relacionados e vetores de expressão. São fornecidos no presente documento vetores (por exemplo, vetores de expressão) que compreendem polinucleotídeos que compreende sequências nucleotídicas que codificam anticorpos anti-CTLA-4 ou um fragmento para expressão recombinante em células hospedeiras, preferencialmente em células de mamífero. Também são fornecidas no presente documento células hospedeiras que compreendem tais vetores para expressarem recombinantemente anticorpos anti-CTLA-4 descritos no presente documento (por exemplo, anticorpo humano ou humanizado). Em um aspecto particular, são fornecidos no presente documento métodos para produzir um anticorpo descrito no presente documento, que compreendem a expressão de tal anticorpo a partir de uma célula hospedeira.

[0282] A expressão recombinante de um anticorpo descrito no presente documento (por exemplo, um anticorpo de comprimento total, cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo, ou um anticorpo de cadeia única descrito no presente documento) que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) envolve a construção de um vetor de expressão contendo um polinucleotídeo que codifica o anticorpo. Uma vez obtido um polinucleotídeo que codifica uma molécula de anticorpo, cadeia

pesada e/ou leve de um anticorpo ou um fragmento do mesmo (por exemplo, regiões variáveis da cadeia pesada e/ou leve) descrito no presente documento, o vetor para a produção da molécula de anticorpo pode ser produzido por tecnologia de DNA recombinante utilizando técnicas bem conhecidas na técnica. Assim, os métodos para preparar uma proteína expressando um polinucleotídeo contendo um anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, cadeia leve ou cadeia pesada) codificando a sequência nucleotídica são descritos no presente documento. Podem ser usados métodos que são bem conhecidos dos versados na técnica para construir vetores de expressão contendo sequências codificantes de anticorpo ou fragmento de anticorpo (por exemplo, cadeia leve ou cadeia pesada) e sinais de controle de transcrição e tradução apropriados. Esses métodos incluem, por exemplo, técnicas de DNA recombinante in vitro, técnicas sintéticas e recombinação genética in vivo. Também são fornecidos vetores replicáveis que compreendem uma sequência nucleotídica codificando uma molécula de anticorpo descrita no presente documento, uma cadeia pesada ou leve de um anticorpo, uma região variável da cadeia pesada ou leve de um anticorpo ou um fragmento do mesmo, ou uma CDR de cadeia pesada ou leve, operativamente ligada para um promotor. Tais vetores podem, por exemplo, incluir a sequência nucleotídica que codifica a região constante da molécula de anticorpo (consulte, por exemplo, Publicações Internacionais nº WO 86/05807 e WO 89/01036; e Patente nº US 5.122.464, que estão incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade) e regiões variáveis do anticorpo podem ser clonadas em um tal vetor para expressão de toda a cadeia pesada, da cadeia leve inteira, ou ambas as cadeias pesadas e leves completas.

[0283] Um vetor de expressão pode ser transferido para uma célula (por exemplo, célula hospedeira) por técnicas convencionais e as células resultantes podem então ser cultivadas por técnicas convencionais para produzir um anticorpo descrito no presente documento ou um fragmento do mesmo. Assim, são no presente documento fornecidas células hospedeiras

contendo um polinucleotídeo que codifica um anticorpo descrito no presente documento ou seus fragmentos, ou uma sua cadeia pesada ou leve, ou fragmento da mesma, ou um anticorpo de cadeia simples descrito no presente documento, operativamente ligado a um promotor para expressão de tais sequências em a célula hospedeira. Em certas modalidades, para a expressão de anticorpos de cadeia dupla, os vetores que codificam ambas as cadeias pesada e leve, individualmente, podem ser co-expressos na célula hospedeira para expressão de toda a molécula de imunoglobulina, como detalhado abaixo. Em certas modalidades, uma célula hospedeira contém um vetor que compreende um polinucleotídeo codificando tanto a cadeia pesada como a cadeia leve de um anticorpo descrito no presente documento, ou um fragmento do mesmo. Em modalidades específicas, uma célula hospedeira contém dois vetores diferentes, em que o um primeiro vetor compreende um polinucleotídeo que codifica uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia pesada de um anticorpo descrito no presente documento, ou um fragmento do mesmo, e um segundo vetor que compreende um polinucleotídeo codificando uma cadeia leve. ou uma região variável de cadeia leve de um anticorpo descrito no presente documento, ou um fragmento do mesmo. Em outras modalidades, uma primeira célula hospedeira compreende um primeiro vetor que compreende um polinucleotídeo codificando uma região variável de cadeia pesada ou de cadeia pesada de um anticorpo descrito no presente documento, ou um fragmento do mesmo, e uma segunda célula hospedeira compreende um segundo vetor que compreende um polinucleotídeo codificando um cadeia leve ou uma região variável de cadeia leve de um anticorpo descrito no presente documento. Em modalidades específicas, uma região variável de cadeia pesada/cadeia pesada expressa por uma primeira célula associada a uma região variável cadeia leve/cadeia leve de uma segunda célula para formar um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em certas modalidades, é

fornecida no presente documento uma população de células hospedeiras que compreende tal primeira célula hospedeira e tal segunda célula hospedeira.

[0284] Em uma modalidade particular, é fornecida no presente documento uma população de vetores que compreende um primeiro vetor que compreende um polinucleotídeo que codifica uma região variável cadeia leve/cadeia leve de um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente, e um segundo vetor que compreende um polinucleotídeo que codifica uma região variável de cadeia pesada/cadeia pesada de um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento.

[0285] Pode utilizar-se uma variedade de sistemas de vetor de expressão hospedeira para expressar as moléculas de anticorpo descrita no presente documentos (consulte, por exemplo, Patente n° US 5.807.715). Tais sistemas de expressão do hospedeiro representam veículos pelos quais as sequências codificantes de interesse podem ser produzidas e subsequentemente purificadas, mas também representam células que podem, quando transformadas ou transfectadas com as sequências de codificação nucleotídicas apropriadas, expressarem uma molécula de anticorpo descrita no presente documento in situ. Esses incluem mas não estão limitados a micro-organismos como bactérias (por exemplo, *E. coli* e *B. subtilis*) transformadas com vetores de expressão de DNA de bacteriófago recombinante, DNA plasmídico ou DNA de cosmídeo contendo sequências de codificação de anticorpo; levedura (por exemplo, *Saccharomyces Pichia*) transformada com vetores de expressão de levedura recombinante contendo sequências de codificação de anticorpo; sistemas de células de inseto infectadas com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, baculovírus) contendo sequências de codificação de anticorpos; sistemas de células vegetais (por exemplo, algas verdes como *Chlamydomonas reinhardtii*) infectados com vetores de expressão de vírus recombinantes (por exemplo, vírus do mosaico da couve-flor, CaMV; vírus do mosaico do tabaco, TMV) ou transformados com vetores de expressão de plasmídeos recombinantes (por exemplo, plasmídeo

Ti) contendo sequências de codificação de anticorpo; ou sistemas de células de mamífero (por exemplo, COS (por exemplo, COS1 ou COS), CHO, BHK, MDCK, HEK 293, NSO, PER.C6, VERO, CRL7030, HsS78Bst, HeLa e NIH 3T3, HEK-293T, HepG2, Células SP210, R1, BW, LM, BSC1, BSC40, YB/20 e BMT10) contendo construções de expressão recombinante contendo promotores derivados do genoma de células de mamíferos (por exemplo, promotor de metalotioneína) ou de vírus de mamíferos (por exemplo, o adenovírus promotor tardio, o promotor 7.5K do vírus vaccinia). Em uma modalidade específica, as células para expressar os anticorpos descritos no presente documento ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo são células CHO, por exemplo, células CHO do CHO GS System™ (Lonza). Em uma modalidade particular, as células para expressar os anticorpos descritos no presente documento são células humanas, por exemplo, linhas celulares humanas. Em uma modalidade específica, um vetor de expressão de mamífero é pOptiVEC™ ou pcDNA3.3. Em uma modalidade particular, as células bacterianas como *Escherichia coli*, ou células eucarióticas (por exemplo, células de mamífero), especialmente para a expressão de molécula de anticorpo recombinante completa, são utilizadas para a expressão de uma molécula de anticorpo recombinante. Por exemplo, células de mamífero como células de ovário de hamster chinês (CHO), em conjunto com um vetor como o principal elemento promotor do gene primário intermediário do citomegalovírus humano um sistema de expressão eficaz para anticorpos (Foeck MK & Hofstetter H Gene 45) : 101-5 e Cockett MI et al, (1990) Biotechnology 8 (7): 662-7, que estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade). Em certas modalidades, os anticorpos descritos no presente documento são produzidos por células CHO ou células NSO. Em uma modalidade específica, a expressão de sequências nucleotídicas codificando anticorpos descritos no presente documento que se ligam especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) é regulada por um promotor constitutivo, promotor induzível ou promotor específico do tecido.

[0286] Em sistemas bacterianos, vários vetores de expressão podem ser vantajosamente selecionados, dependendo da utilização pretendida para a molécula de anticorpo a ser expressa. Por exemplo, quando se pretende produzir uma grande quantidade de tal anticorpo, para a produção de composições farmacêuticas de uma molécula de anticorpo, podem ser desejáveis vetores que dirijam a expressão de elevados níveis de produtos proteicos de fusão que são facilmente purificados. Tais vetores incluem, mas não se limitam ao vetor de expressão de *E. coli* pUR278 (Ruter U & Mueller-Hill B (1983) EMBO J 2: 1.791 a 1.794, incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade), em que a sequência de codificação de anticorpo pode ser ligada individualmente ao vetor em enquadramento com a região codificante de lac Z, de modo que seja produzida uma proteína de fusão; vetores pIN (Inouye S e Inouye M (1985) Nuc Acids Res 13: 3.101 a 3.109; Van Heeke G e Schuster SM (1989) J Biol Chem 24: 5.503 a 5.509, que estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade); e similares. Por exemplo, os vetores pGEX também podem ser usados para expressar polipeptídeos estranhos como proteínas de fusão com glutathione S-transferase (GST). Em geral, tais proteínas de fusão são solúveis e podem ser facilmente purificadas a partir de células lisadas por adsorção e ligação a esferas de agarose de glutathione da matriz, seguida por eluição na presença de glutathione livre. Os vetores pGEX são concebidos para incluir locais de clivagem por proteinase de trombina ou fator Xa, de modo que o produto gênico alvo clonado possa ser liberado da porção de GST.

[0287] Em um sistema de insetos, o vírus da poliedrose nuclear *Autographa californica* (AcNPV), por exemplo, pode ser usado como um vetor para expressar genes estranhos. O vírus cresce em células de *Spodoptera frugiperda*. A sequência de codificação do anticorpo pode ser clonada individualmente em regiões não essenciais (por exemplo, o gene da poliedrina) do vírus e colocada sob o controle de um promotor AcNPV (por exemplo, o promotor da poliedrina).

[0288] Nas células hospedeiras de mamíferos, podem ser usados inúmeros sistemas de expressão à base de vírus. Nos casos em que um adenovírus é utilizado como um vetor de expressão, a sequência de codificação do anticorpo de interesse pode ser ligada a um complexo de controle de transcrição/tradução de adenovírus, por exemplo, o promotor tardio e a sequência líder tripartida. Esse gene quimérico pode então ser inserido no genoma do adenovírus por recombinação *in vitro* ou *in vivo*. A inserção em uma região não essencial do genoma viral (por exemplo, região E1 ou E3) resultará em um vírus recombinante que é viável e com capacidade de expressar a molécula de anticorpo em hospedeiros infectados (por exemplo, consulte Logan J & Shenk T (1984) PNAS 81 (12): 3655-9, incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade). Sinais de iniciação específicos também podem ser necessários para tradução eficiente de sequências de codificação de anticorpo inseridas. Esses sinais incluem o códon de iniciação ATG e sequências adjacentes. Além disso, o códon de iniciação deve estar em fase com o quadro de leitura da sequência de codificação desejada para assegurar a tradução de todo o inserto. Esses sinais de controle da tradução exógenos e códons de iniciação podem ser de uma variedade de origens, tanto naturais como sintéticas. A eficiência da expressão pode ser aumentada pela inclusão de elementos potenciadores de transcrição apropriados, terminadores de transcrição, etc. (consulte, por exemplo, Bitter G et al, (1987) Methods Enzymol. 153: 516 a 544, incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade).

[0289] Além disso, pode ser escolhida uma cepa de célula hospedeira que modula a expressão das sequências inseridas, ou modifica e processa o produto do gene da maneira específica desejada. Tais modificações (por exemplo, glicosilação) e processamento (por exemplo, clivagem) de produtos proteicos podem ser importantes para a função da proteína. Diferentes células hospedeiras têm mecanismos característicos e específicos para o processamento pós-tradução e modificação de proteínas e

produtos genéticos. Podem ser escolhidas linhas celulares ou sistemas hospedeiros apropriados para assegurar a modificação e processamento corretos da proteína estranha expressa. Para esse fim, podem ser utilizadas células hospedeiras eucarióticas que possuem o mecanismo celular para o processamento adequado do transcrito primário, glicosilação e fosforilação do produto génico. Tais células hospedeiras de mamífero incluem, mas não se limitam a CHO, VERO, BHK, Hela, MDCK, HEK 293, NIH 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 e T47D, NSO (uma linha celular de mieloma murino que não produz endogenamente quaisquer cadeias de imunoglobulina), células CRL7030, COS (por exemplo, COS 1 ou COS), PER.C6, VERO, HsS78Bst, HEK-293T, HepG2, SP210, R 1.1 I, BW, L-M, BSC1, BSC40, YB/20, BMT10 e HsS78Bst. Em certas modalidades, os anticorpos anti-CTLA-4 descritos no presente documento são produzidos em células de mamífero, como células de CHO.

[0290] Em uma modalidade específica, os anticorpos descritos no presente documento ou os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos têm um teor reduzido de fucose ou nenhum teor de fucose. Tais anticorpos podem ser produzidos utilizando técnicas conhecidas pelos versados na técnica. Por exemplo, os anticorpos podem ser expressos em células deficientes ou sem capacidade de fucosilar. Em um exemplo específico, linhas celulares com um knockout de ambos os alelos de α 1,6-fucosiltransferase podem ser utilizadas para produzir anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos com teor reduzido de fucose. O sistema Potelligent (Lonza) é um exemplo de tal sistema que pode ser usado para produzir anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos com conteúdo reduzido de fucose.

[0291] Para a produção a longo prazo, de alto rendimento, de proteínas recombinantes, células de expressão estáveis podem ser geradas. Por exemplo, linhas celulares que expressam estavelmente um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento ou um fragmento de

ligação ao antígeno do mesmo podem ser manipuladas. Em modalidades específicas, uma célula no presente documento fornecida estavelmente expressa uma região variável de cadeia pesada/cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada/cadeia pesada que se associa para formar um anticorpo descrito no presente documento ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[0292] Em certos aspectos, em vez de usar vetores de expressão que contêm origens de replicação virais, as células hospedeiras podem ser transformadas com DNA controlado por elementos de controle de expressão apropriados (por exemplo, promotor, potencializador, sequências, terminadores de transcrição, sítios de poliadenilação, etc.) e um marcador selecionável. Após a introdução do DNA/polinucleotídeo estranho, pode-se permitir que as células modificadas cresçam durante 1-2 dias em um meio enriquecido e depois são mudadas para um meio seletivo. O marcador selecionável no plasmídeo recombinante confere resistência à seleção e permite que as células integrem estavelmente o plasmídeo nos seus cromossomos e cresçam para formar focos que por sua vez podem ser clonados e expandidos em linhas celulares. Esse método pode ser vantajosamente utilizado para conceber linhas celulares que expressam um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento ou um fragmento do mesmo. Tais linhas celulares manipuladas podem ser particularmente úteis no rastreio e avaliação de composições que interagem direta ou indiretamente com a molécula de anticorpo.

[0293] Podem ser usados inúmeros sistemas de seleção, incluindo, mas não limitado a genes do vírus herpes simplex timidina quinase (Wigler M et al, (1977) Cell 11 (1): 223-32), hipoxantineguanina fosforibosiltransferase (Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS 48 (12): 2.026 a 2.034, incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade) e adenina fosforibosiltransferase (Lowy I et al., (1980) Cell 22 (3): 817-23, incorporado ao presente documento a título de referência na sua

em sua totalidade) em células tk, hgprt ou aprt, respectivamente. Além disso, a resistência antimetabólito pode ser usada como base de seleção para os seguintes genes: dhfr, que confere resistência ao metotrexato (Wigler M et al, (1980) PNAS 77 (6): 3567-70; O'Hare K et al, (1981) PNAS 78: 1527-31); gpt, que confere resistência ao ácido micofenólico (Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78 (4): 2072-6); neo, que confere resistência ao aminoglicosídeo G-418 (Wu GY e Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87 a 95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573 a 596; Mulligan RC (1993) Science 260: 926 a 932 e Morgan RA e Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191 a 217, Nabel GJ e Feigner PL (1993) Trends Biotechnol 11 (5): 211-5); e higo, que confere resistência à higromicina (Santerre RF et al, (1984) Gene 30 (1-3): 147-56), os quais estão incorporados ao presente documentos a título de referência em sua totalidade. Os métodos vulgarmente conhecidos na técnica da tecnologia de DNA recombinante podem ser aplicados rotineiramente para selecionar o clone recombinante desejado e tais métodos são descritos, por exemplo, em Ausubel FM et al, (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons. NY (1993); Kriegler M, Gene Transfer and Expression, A, Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); e nos Capítulos 12 e 13, Dracopoli NC et al., (eds.) Current Protocols in Human Genetics, John Wiley @ Sons, NY (1994); Colbere-Garapin F et al, (1981) J Mol Biol 150: 1 a 14, que estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0294] Os níveis de expressão de uma molécula de anticorpo podem ser aumentados por amplificação de vetores (para uma revisão, veja Bebbington CR & Hentschel CCG, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, Nova York, 1987), incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade). Quando um marcador no sistema vetor expressando o anticorpo é amplificável, o aumento no nível de inibidor presente na cultura da célula hospedeira aumentará o número de cópias do gene marcador. Uma vez que a região amplificada está

associada ao gene do anticorpo, a produção do anticorpo também aumentará (Crouse GF et al, (1983) Mol Cell Biol 3: 257-66, incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade).

[0295] A célula hospedeira pode ser cotransfectada com dois ou mais vetores de expressão descritos no presente documento, em que o primeiro vetor codifica um polipeptídeo derivado da cadeia pesada e o segundo vetor codifica um polipeptídeo derivado da cadeia leve. Os dois vetores podem conter marcadores selecionáveis idênticos que permitem a expressão igual de polipeptídeos da cadeia pesada e leve. As células hospedeiras podem ser cotransfectadas com diferentes quantidades dos dois ou mais vetores de express. Por exemplo, as células hospedeiras podem ser transfectadas com qualquer uma das razões seguintes entre um primeiro vetor de expressão e um segundo vetor de expressão: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:12, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45 ou 1:50.

[0296] Alternativamente, pode ser utilizado um único vetor que codifica e tem a capacidade de expressar polipeptídeos de cadeia pesada e leve. Em tais situações, a cadeia leve deve ser colocada antes da cadeia pesada para evitar um excesso de cadeia pesada livre tóxica (Proudfoot NJ (1986) Nature 322: 562 a 565; e Kohler G (1980) PNAS 77: 2.197 a 2.199, que estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade). As sequências de codificação para as cadeias pesada e leve podem compreender cDNA ou DNA genômico. O vetor de expressão pode ser monocistrônico ou multicistrônico. Um construto multicistrônico de ácido nucleico pode codificar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais, ou no intervalo de 2-5, 5-10 ou 10-20 genes/sequências nucleotídicas. Por exemplo, um construto de ácido nucleico bicistrônico pode compreender na seguinte ordem um promotor, um primeiro gene (por exemplo, cadeia pesada de um anticorpo descrito no presente documento) e um segundo gene e (por exemplo, cadeia leve de um anticorpo descrito no presente documento). Em tal vetor de expressão, a transcrição de ambos os genes pode ser conduzida pelo promotor, enquanto

que a tradução do mRNA do primeiro gene pode ser por um mecanismo de pesquisa dependente do cap e a tradução do mRNA do segundo gene pode ser por um mecanismo independente de limite, por exemplo, por um IRES.

[0297] Uma vez que uma molécula de anticorpo descrita no presente documento tenha sido produzida por expressão recombinante, ela pode ser purificada por qualquer método conhecido na técnica para purificação de uma molécula de imunoglobulina, por exemplo, por cromatografia (por exemplo, troca iônica, afinidade, particularmente por afinidade para o antígeno específico após a Proteína A, e cromatografia em coluna de dimensionamento), centrifugação, solubilidade diferencial, ou por qualquer outra técnica padrão para a purificação de proteínas. Além disso, os anticorpos descritos no presente documento podem ser fundidos com sequências polipeptídicas heterólogas descrita no presente documentos ou de outro modo conhecidas na técnica para facilitar a purificação.

[0298] Em modalidades específicas, um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo descrito no presente documento é isolado ou purificado. Geralmente, um anticorpo isolado é aquele que é substancialmente isento de outros anticorpos com especificidades antigênicas diferentes do que o anticorpo isolado. Por exemplo, em uma modalidade particular, uma preparação de um anticorpo descrito no presente documento é substancialmente livre de material celular e/ou precursores químicos. A expressão “substancialmente livre de material celular” inclui preparações de um anticorpo em que o anticorpo é separado dos componentes celulares das células a partir das quais é isolado ou produzido de forma recombinante. Assim, um anticorpo que é substancialmente livre de material celular inclui preparações de anticorpo com menos de cerca de 30%, 20%, 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5% ou 0,1% (em peso seco) de proteína heteróloga (também referida no presente documento como uma “proteína contaminante”) e/ou variantes de um anticorpo, por exemplo, formas modificadas pós-tradução diferentes de um anticorpo ou outras versões diferentes de um anticorpo (por exemplo,

fragmentos de anticorpo). Quando o anticorpo é produzido de forma recombinante, é também geralmente substancialmente livre de meio de cultura, isto é, meio de cultura representa menos de cerca de 20%, 10%, 2%, 1%, 0,5% ou 0,1% do volume da preparação proteica. Quando o anticorpo é produzido por síntese química, é geralmente substancialmente livre de precursores químicos ou outros produtos químicos, isto é, é separado de precursores químicos ou outras substâncias químicas que estão envolvidas na síntese da proteína. Consequentemente, tais preparações do anticorpo têm menos de cerca de 30%, 20%, 10% ou 5% (em peso seco) de precursores químicos ou compostos diferentes do anticorpo de interesse. Em uma modalidade específica, os anticorpos descritos no presente documento são isolados ou purificados.

[0299] Anticorpos ou fragmentos dos mesmos que se ligam especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) podem ser produzidos por qualquer método conhecido na técnica para a síntese de anticorpos, por exemplo, por síntese química ou por técnicas de expressão recombinante. Os métodos descritos no presente documento empregam, salvo indicação em contrário, técnicas convencionais em biologia molecular, microbiologia, análise genética, DNA recombinante, química orgânica, bioquímica, PCR, síntese e modificação de oligonucleotídeos, hibridização de ácido nucleico e campos relacionados dentro da perícia na técnica. Essas técnicas são descritas, por exemplo, nas referências no presente documento citadas e estão totalmente explicadas na literatura. Consulte, por exemplo, Maniatis T et al. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al, (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (2001) *Molecular Cloning: A Manual of Laboratory*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 e atualizações anuais); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons

(1987 e atualizações anuais) Gait (ed.) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren B et al, (eds.) (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, todas as quais estão incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0300] Em uma modalidade específica, um anticorpo descrito no presente documento é um anticorpo (por exemplo, anticorpo recombinante) preparado, expresso, criado ou isolado por qualquer meio que envolva criação, por exemplo, via síntese, engenharia genética de sequências de DNA. Em certas modalidades, tal anticorpo compreende sequências (por exemplo, sequências de DNA ou sequências de aminoácidos) que não existem naturalmente no repertório de linha germinal de anticorpo de um animal ou mamífero (por exemplo, humano) in vivo.

[0301] Em um aspecto, é fornecido no presente documento um método de fazer um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) que compreende a cultura de uma célula ou célula hospedeira descrita no presente documento. Em um certo aspecto, é fornecido no presente documento um método para produzir um anticorpo ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) que compreende expressar (por exemplo, expressão recombinante) o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno utilizando uma célula ou célula hospedeira descrita no presente documento (por exemplo, uma célula ou uma célula hospedeira que compreende polinucleotídeos que codificam um anticorpo descrito no presente documento). Em uma modalidade particular, a célula é uma célula isolada. Em uma modalidade particular, os polinucleotídeos exógenos foram introduzidos na célula. Em uma modalidade particular, o método compreende ainda a etapa de purificação do anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo obtido

a partir da célula ou célula hospedeira. De preferência, o método é realizado in vitro.

[0302] Os métodos para produzir anticorpos policlonais são conhecidos na técnica (consulte, por exemplo, Capítulo 11 em: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5ª Ed., Ausubel FM et al, eds., John Wiley e Sons, Nova York, incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade).

[0303] Os anticorpos monoclonais podem ser preparados usando uma ampla variedade de técnicas conhecidas na técnica, incluindo o uso de tecnologias de hibridoma, recombinante e de exibição em fagos, ou uma combinação das mesmas. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos utilizando técnicas de hibridoma incluindo aquelas conhecidas na técnica e ensinadas, por exemplo, em Harlow E & Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ed. 1988); Hammerling GJ et al, em: Monoclonal Antibodies and T-Cells Hybridomas 563 681 (Elsevier, NY, 1981), que estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade. O termo “anticorpo monoclonal” conforme usado no presente documento não está limitado a anticorpos produzidos através da tecnologia de hibridoma. Por exemplo, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos de forma recombinante a partir de células hospedeiras expressando exogenamente um anticorpo descrito no presente documento ou um fragmento do mesmo, por exemplo, cadeia leve e/ou cadeia pesada de tal anticorpo.

[0304] Em modalidades específicas, um “anticorpo monoclonal”, como usado no presente documento, é um anticorpo produzido por uma única célula (por exemplo, hibridoma ou célula hospedeira produzindo um anticorpo recombinante), em que o anticorpo se liga especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) conforme determinado, por exemplo, por ELISA ou outro ensaio de ligação competitiva ou de ligação ao antígeno conhecido na técnica ou nos exemplos fornecidos no presente documento. Em

modalidades particulares, um anticorpo monoclonal pode ser um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado. Em certas modalidades, um anticorpo monoclonal é um anticorpo monovalente ou anticorpo multivalente (por exemplo, bivalente). Em modalidades particulares, um anticorpo monoclonal é um anticorpo monoespecífico ou multiespecífico (por exemplo, anticorpo biespecífico). Os anticorpos monoclonais descritos no presente documento podem ser produzidos, por exemplo, pelo método do hibridoma conforme descrito em Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495, incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade, ou pode, por exemplo, ser isolado de bibliotecas de fagos usando as técnicas como descrita no presente documentos, por exemplo. Outros métodos para a preparação de linhas celulares clonais e de anticorpos monoclonais assim expressos são bem conhecidos na técnica (consulte, por exemplo, Capítulo 11 em: *Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5ª Ed., Ausubel FM et al, supra).

[0305] Os métodos para produzir e rastrear anticorpos específicos utilizando tecnologia de hibridoma são rotineiros e bem conhecidos na técnica. Por exemplo, no método de hibridoma, um camundongo ou outro animal hospedeiro apropriado, como um macaco de ovelha, cabra, coelho, camundongo, hamster ou macaco, é imunizado para induzir linfócitos que produzem ou têm a capacidade de produzir anticorpos que se ligarão especificamente à proteína (por exemplo, CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) usada para imunização. Alternativamente, os linfócitos podem ser imunizados in vitro. Os linfócitos são então fundidos com células de mieloma utilizando um agente de fusão adequado, como polietilenoglicol, para formar uma célula de hibridoma (Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59 a 103 (Academic Press, 1986), incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade). Adicionalmente, pode ser utilizada uma técnica de RIMMS (múltiplos sítios de imunização repetitiva) para imunizar um animal (Kilpatrick KE et al., (1997) *Hybridoma* 16:

381-9, incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade).

[0306] Em algumas modalidades, camundongos (ou outros animais, como ratos, macacos, burros, porcos, carneiros, hamsters ou cães) podem ser imunizados com um antígeno (por exemplo, CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e uma vez detectada uma resposta imune, por exemplo, anticorpos específicos para o antígeno são detectados no soro de camundongo, o baço de camundongo é coletado e os esplenócitos isolados. Os esplenócitos são, então, fundidos por técnicas bem conhecidas a quaisquer células de mieloma adequadas, por exemplo, células da linha celular SP20 disponíveis da American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA), para formar hibridomas. Os hibridomas são selecionados e clonados por diluição limitada. Em certas modalidades, os nódulos linfáticos dos camundongos imunizados são coletados e fundidos a células de mieloma NS0.

[0307] As células de hibridoma assim preparadas são semeadas e crescidas em um meio de cultura adequado que preferivelmente contém uma ou mais substâncias que inibem o crescimento ou sobrevivência das células de mieloma parentais não fundidas. Por exemplo, se as células do mieloma parental não possuem a enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferase (HGPRT ou HPRT), o meio de cultura para os hibridomas incluirá tipicamente hipoxantina, aminopterina e timidina (meio HAT), substâncias essas que impedem o crescimento de deficiência de HGPRT células.

[0308] As modalidades específicas empregam células de mieloma que se fundem eficientemente, suportam a produção estável de alto nível de anticorpo pelas células produtoras de anticorpo selecionadas, e são sensíveis a um meio como meio HAT. Entre essas linhas celulares de mieloma encontram-se linhas de mieloma murino, como linha celular de NS0 ou aquelas derivadas de tumores de murganho MOPC-21 e MPC-11 disponíveis no Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, EUA e Células SP-2 ou X63-Ag8.653 disponíveis na American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA.

Linhas celulares de mieloma humano e de heteromieloma camundongo-humano também foram descritas para a produção de anticorpos monoclonais humanos (Kozbor D (1984) J Immunol 133: 3001-5; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 51 a 63 (Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1987), que estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade).

[0309] O meio de cultura em que as células de hibridoma estão a crescer é ensaiado quanto à produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano). A especificidade de ligação de anticorpos monoclonais produzidos por células de hibridoma é determinada por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, imunoprecipitação ou por um ensaio de ligação in vitro, como radioensaio (RIA) ou ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA).

[0310] Depois de identificadas as células de hibridoma que produzem anticorpos da especificidade, afinidade e/ou atividade desejadas, os clones podem ser subclonados por procedimentos de diluição limitante e cultivados por métodos padrão (Goding JW (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, supra). Meios de cultura adequados para esse fim incluem, por exemplo, meio D-MEM ou RPMI 1640. Além disso, as células de hibridoma podem ser cultivadas in vivo como tumores ascíticos em um animal.

[0311] Os anticorpos monoclonais segregados pelos subclones são adequadamente separados do meio de cultura, fluido ascítico ou soro por procedimentos convencionais de purificação de imunoglobulina como, por exemplo, proteína A-Sepharose, cromatografia de hidroxilapatita, eletroforese em gel, diálise ou cromatografia por afinidade.

[0312] Os anticorpos descritos no presente documento incluem fragmentos de anticorpo que reconhecem CTLA-4 específico (por exemplo, CTLA-4 humano) e podem ser gerados por qualquer técnica conhecida pelos versados na técnica. Por exemplo, fragmentos Fab e F(ab')₂

descritos no presente documento podem ser produzidos por clivagem proteolítica de moléculas de imunoglobulina, utilizando enzimas como papaína (para produzir fragmentos Fab) ou pepsina (para produzir fragmentos F(ab')₂). Um fragmento Fab corresponde a um dos dois braços idênticos de uma molécula de anticorpo e contém a cadeia leve completa emparelhada com os domínios VH e CH1 da cadeia pesada. O fragmento F (ab')₂ contém os dois braços de ligação ao antígeno de uma molécula de anticorpo ligada por ligações dissulfureto na região de dobradiça.

[0313] Além disso, os anticorpos descritos no presente documento ou os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos podem também ser gerados utilizando vários métodos de apresentação de fagos conhecidos na técnica. Nos métodos de apresentação de fagos, os domínios de anticorpo funcionais são apresentados na superfície de partículas físicas que transportam as sequências de polinucleotídeos que as codificam. Em particular, as sequências de DNA que codificam os domínios VH e VL são amplificadas a partir de bibliotecas de cDNA de animais (por exemplo, bibliotecas de cDNA humanas ou murinas de tecidos afetados). O ADN que codifica os domínios VH e VL é recombinado juntamente com um ligante scFv por PCR e clonado em um vetor fagemídeo. O vetor é eletroporado em *E. coli* e a *E. coli* é infectada com fago auxiliar. Os fagos usados nesses métodos são tipicamente fagos filamentosos incluindo fd e M13, e os domínios VH e VL são usualmente fundidos de forma recombinante com o gene III do fago ou com o gene VIII. O fago que expressa um domínio de ligação ao antígeno que se liga a um antígeno particular pode ser selecionado ou identificado com o antígeno, por exemplo, utilizando antígeno marcado ou antígeno ligado ou capturado em uma superfície sólida ou conta. Exemplos de métodos de apresentação em fagos que podem ser usados para preparar os anticorpos descritos no presente documento incluem os divulgados em Brinkman U et al, (1995) *J Immunol Methods* 182: 41 a 50; Ames RS et al., (1995) *J Immunol Methods* 184: 177 a 186; Kettleborough CA et al, (1994) *Eur J Immunol* 24: 952 a 958; Persic L et

al, (1997) Gene 187: 9 a 18; Burton DR e Barbas CF (1994) Advan Immunol 57: 191-280; Pedido n° PCT PCT/GB91/001134; Publicações Internacionais n° WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401 e WO 97/13844; e as Patentes n° US 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727, 5.733.743 e 5.969, 108, todas incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0314] Como descrito nas referências acima, após a seleção do fago, as regiões de codificação do anticorpo do fago podem ser isoladas e usadas para gerar anticorpos inteiros, incluindo anticorpos humanos, ou qualquer outro fragmento de ligação ao antígeno desejado, e expressos em qualquer hospedeiro desejado, incluindo células de mamífero, células de inseto, células vegetais, levedura e bactérias, por exemplo, conforme descrito abaixo. As técnicas para produzir recombinantemente fragmentos de anticorpo, como fragmentos Fab, Fab 'e F(ab')₂ também podem ser empregadas utilizando métodos conhecidos na técnica, como aqueles revelados na publicação n° PCT WO 92/22324; Mullinax RL et al, (1992) BioTechniques 12 (6): 864-9; Sawai H et al, (1995) Am J Reprod Immunol 34: 26-34; e Better M et al, (1988) Science 240: 1.041 a 1.043, todos os quais estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Em certas modalidades, para gerar anticorpos inteiros, primers de PCR incluindo sequências nucleotídicas VH ou VL, um sítio de restrição e uma sequência flanqueadora para proteger o sítio de restrição podem ser usados para amplificar as sequências VH ou VL de um modelo, por exemplo, clones scFv. Utilizando técnicas de clonagem conhecidas pelos versados na técnica, os domínios VH amplificados por PCR podem ser clonados em vetores que expressam uma região VH constante, e os domínios VL amplificados por PCR podem ser clonados em vetores expressando uma região constante VL, por exemplo, kappa humano ou regiões constantes de lambda. Os domínios VH e VL também podem ser clonados em um vetor expressando as regiões

constantes necessárias. Os vetores de conversão da cadeia pesada e os vetores de conversão da cadeia leve são então cotransfectados em linhas celulares para gerar linhas celulares estáveis ou transientes que expressam anticorpos de comprimento total, por exemplo, IgG, utilizando técnicas conhecidas pelos versados na técnica.

[0315] Um anticorpo quimérico é uma molécula em que diferentes porções do anticorpo são derivados de diferentes moléculas de imunoglobulina. Por exemplo, um anticorpo quimérico pode conter uma região variável de um anticorpo monoclonal de camundongo ou rato fundido com uma região constante de um anticorpo humano. Os métodos para produzir anticorpos quiméricos são conhecidos na técnica. Consulte, por exemplo, Morrison SL (1985) Science 229: 1202-7; Oi VT e Morrison SL (1986) BioTechniques 4: 214 a 221; Gillies SD et al, (1989) J Immunol Methods 125: 191 a 202; e as Patentes nº US 5.807.715, 4.816.567, 4.816.397 e 6.331.415, todas as quais estão incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0316] Um anticorpo humanizado tem a capacidade de se ligar a um antígeno predeterminado e que compreende uma região estrutural que tem substancialmente a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina humana e CDRs que tem substancialmente a sequência de aminoácidos de uma imunoglobulina não humana (por exemplo, uma imunoglobulina murina). Em modalidades particulares, um anticorpo humanizado também compreende pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente a de uma imunoglobulina humana. O anticorpo também pode incluir as regiões CH1, dobradiça, CH2, CH3 e CH4 da cadeia pesada. Um anticorpo humanizado pode ser selecionado de qualquer classe de imunoglobulinas, incluindo IgM, IgG, IgD, IgA e IgE e qualquer isótipo, incluindo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Os anticorpos humanizados podem ser produzidos utilizando uma variedade de técnicas conhecidas na técnica, incluindo, mas não se limitando a, enxerto de CDR

(Patente nº EP 239400; Publicação Internacional nº WO 91/09967; e Patente nº US 5.225.539, 5.530. 101 e 5.585.089), recobrimento ou resurfacing (Patentes nº EP 592106 e EP 519596; Padlan EA (1991) Mol Immunol 28 (4/5): 489 a 498; Studnicka GM et al., (1994) Prot Engineering 7 (6): 805 a 814, e Roguska MA et al, (1994) PNAS 91: 969 a 973), embaralhamento de cadeias (Patente nº US 5.565.332) e técnicas reveladas, por exemplo, nas Patente nº 6.407.213, Patente nº US 5.766.886, Publicação Internacional nº WO 93/17105; Tan P et al, (2002) J Immunol 169: 1119-25; Caldas C et al, (2000) Protein Eng. 13 (5): 353-60; Morea V et al, (2000) Methods 20 (3): 267-79; Baca M et al, (1997) J Biol Chem 272 (16): 10678-84; Roguska MA et al, (1996) Protein Eng 9 (10): 895 904; Couto JR et al, (1995) Cancer Res. 55 (23 Supp): 5973s-5977s; Couto JR et al, (1995) Cancer Res 55 (8): 1717-22; Sandhu JS (1994) Gene 150 (2): 409-10 e Pedersen JT et al, (1994) J Mol Biol 235 (3): 959-73, todos os quais estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Consulte também a publicação do pedido de patente US 2005/0042664 AI (24 de fevereiro de 2005), que está incorporada ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0317] Foram descritos métodos para a produção de anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos), consulte, por exemplo, as Patentes nº US 7.951.917; 7.183.076; 8.227.777; 5.837.242; 5.989.830; 5.869.620; 6.132.992 e 8.586.713, todas incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0318] Anticorpos de domínio único, por exemplo, anticorpos sem as cadeias leves, podem ser produzidos por métodos bem conhecidos na técnica. Consulte Riechmann L & Muyldermans S (1999) J Immunol 231: 25 a 38; Nuttall SD et al, (2000) Curr Pharm Biotechnol 1 (3): 253 a 263; Muyldermans S, (2001) J Biotechnol 74 (4): 277 a 302; Patente nº US 6.005.079; e Publicações Internacionais nº WO 94/04678, WO 94/25591 e WO 01/44301, todas as quais estão incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0319] Além disso, anticorpos que se ligam especificamente a um antígeno CTLA-4 podem, por sua vez, ser usados para gerar anticorpos anti-idiotipo que “mimetizam” um antígeno usando técnicas bem conhecidas pelos versados na técnica. (Consulte, por exemplo, Greenspan NS & Bona CA (1989) FASEB J 7 (5): 437 a 444 e Nissinoff A (1991) J Immunol 147 (8): 2.429 a 2.438, que estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade).

[0320] Em modalidades particulares, um anticorpo descrito no presente documento, que se liga ao mesmo epítipo de CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) como um anticorpo anti-CTLA-4 descrito no presente documento, é um anticorpo humano ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo. Em modalidades particulares, um anticorpo descrito no presente documento, que bloqueia competitivamente (por exemplo, de uma maneira dependente da dose) qualquer um dos anticorpos descritos no presente documento, da ligação a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano), é um anticorpo humano ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Os anticorpos humanos podem ser produzidos utilizando qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, camundongos transgênicos que têm a capacidade de expressarem imunoglobulinas endógenas funcionais, mas que podem expressar genes de imunoglobulina humana, podem ser usados. Em particular, os complexos do gene da imunoglobulina de cadeia pesada e leve podem ser introduzidos aleatoriamente ou por recombinação homóloga em células-tronco embrionárias de camundongo. Alternativamente, a região variável humana, região constante e região de diversidade podem ser introduzidas em células-tronco embrionárias de camundongo além dos genes de cadeias pesadas e leves humanas. Os genes de imunoglobulina de cadeia pesada e leve de camundongo podem ser tornados não funcionais separada ou simultaneamente com a introdução de loci de imunoglobulina humana por recombinação homóloga. Em particular, a deleção homozigótica da região JH impede a produção de anticorpos endógenos. As células-tronco embrionárias

modificadas são expandidas e microinjetadas em blastocistos para produzir camundongos quiméricos. Os camundongos quiméricos são, então, criados para produzir descendência homozigótica que expressa anticorpos humanos. Os camundongos transgênicos são imunizados da maneira normal com um antígeno selecionado, por exemplo, toda ou uma parte de um antígeno (por exemplo, CTLA-4). Os anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno podem ser obtidos a partir dos camundongos transgênicos imunizados utilizando tecnologia de hibridoma convencional. Os transgenes de imunoglobulina humana abrigados pelos camundongos transgênicos reorganizam-se durante a diferenciação de células B e, subsequentemente, sofrem mutação de classe e somática. Assim, utilizando tal técnica, é possível produzir anticorpos IgG, IgA, IgM e IgE terapeuticamente úteis. Para uma visão geral dessa tecnologia para a produção de anticorpos humanos, consulte Lonberg N & Huszar D (1995) Int Rev Immunol 13: 65 a 93, que está incorporado ao presente documento a título de referência em sua totalidade. Para uma discussão detalhada dessa tecnologia para produzir anticorpos humanos e anticorpos monoclonais humanos e protocolos para produzir tais anticorpos, consulte, por exemplo, as Publicações Internacionais nº WO 98/24893, WO 96/34096 e WO 96/33735; e Patentes nº US 5.413.923, 5.625, 126, 5.633.425, 5.569.825, 5.661.016, 5.545.806, 5.814.318 e 5.939.598. Exemplos de camundongos com capacidade de produzir anticorpos humanos incluem o Xenomouse™ (Abgenix, Inc.; Patentes nº US 6.075.181 e 6.150.184), o HuAb-Mouse™ (Medarex, Inc./Gen Pharm; Patentes nº US 5.545.806 e 5.569.825), o Trans Chromo Mouse™ (Kirin) e o KM Mouse™ (Medarex/Kirin), os quais estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0321] Os anticorpos humanos que se ligam especificamente a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) podem ser produzidos por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, incluindo métodos de apresentação em fagos descritos acima utilizando bibliotecas de

anticorpos derivadas de sequências de imunoglobulina humana. Consulte também as patentes nº US 4.444.887, 4.716.111 e 5.885.793; e Publicações Internacionais nº WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 e WO 91/10741, todas incorporadas ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

[0322] Em algumas modalidades, os anticorpos humanos podem ser produzidos utilizando hibridomas de humano-camundongo. Por exemplo, os linfócitos de sangue periférico humano transformados com o vírus Epstein-Barr (EBV) podem ser fundidos com células de mieloma de camundongo para produzir hibridomas de camundongo-humanos secretando anticorpos monoclonais humanos, e esses hibridomas de camundongo-humanos podem ser rastreados para determinar quais secretam anticorpos monoclonais humanos. anticorpos que se ligam especificamente a um antígeno alvo (por exemplo, CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano). Tais métodos são conhecidos e estão descritos na técnica, consulte, por exemplo, Shinmoto H et al, (2004) Cytotechnology 46: 19 a 23; Naganawa Y et al, (2005) Human Anticorpos 14: 27 a 31, que estão incorporados ao presente documento a título de referência em sua totalidade.

6.6 KITS

[0323] Também são fornecidos kits que compreendem um ou mais anticorpos descritos no presente documento, ou composição farmacêutica ou conjugados dos mesmos. Em uma modalidade específica, é fornecida no presente documento uma embalagem ou kit farmacêutico que compreende um ou mais recipientes cheios com um ou mais dos ingredientes das composições farmacêuticas descritas no presente documentos, como um ou mais anticorpos fornecidos no presente documento ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em algumas modalidades, os kits contêm uma composição farmacêutica descrita no presente documento e qualquer agente profilático ou terapêutico, como os descritos no presente documento. Em certas modalidades, os kits podem conter um mitogênio de células T, como, por

exemplo, fito-hemaglutinina (PHA) e/ou acetato de miristato de forbol (PMA), ou um anticorpo estimulador complexo de TCR, como um anticorpo anti-CD3 e anticorpo anti-CD28. Opcionalmente associado a esse recipiente (ou recipientes) pode estar um aviso na forma prescrita por um órgão governamental que regula a fabricação, o uso ou a comercialização de produtos farmacêuticos ou biológicos, cujo aviso reflete a aprovação pela agência de fabricação, uso ou comercialização para administração humana.

[0324] Também são fornecidos kits que podem ser usados nos métodos acima. Em uma modalidade, um kit compreende um anticorpo descrito no presente documento, de preferência, um anticorpo purificado, em um ou mais recipientes. Em uma modalidade específica, os kits descritos no presente documento contêm um antígeno CTLA-4 substancialmente isolado (por exemplo, CTLA-4 humano) como controle. Em outra modalidade específica, os kits descritos no presente documento compreendem ainda um anticorpo de controle que não reage com um antígeno CTLA-4. Em outra modalidade específica, os kits descritos no presente documento contêm um ou mais elementos para detectar a ligação de um anticorpo a um antígeno de CTLA-4 (por exemplo, o anticorpo pode ser conjugado com um substrato detectável, como um composto fluorescente, um substrato enzimático, um radioativo) ou um composto luminescente, ou um segundo anticorpo que reconhece o primeiro anticorpo pode ser conjugado com um substrato detectável). Em modalidades específicas, um kit fornecido no presente documento pode incluir um antígeno de CTLA-4 recombinantemente produzido ou quimicamente sintetizado. O antígeno CTLA-4 fornecido no kit também pode ser anexado a um suporte sólido. Em uma modalidade mais específica, os meios de detecção do kit descrito acima incluem um suporte sólido ao qual está ligado um antígeno CTLA-4. Tal kit pode também incluir um anticorpo anti-humano marcado com repórter não ligado ou anticorpo anti-camundongo/rato. Nessa modalidade, a ligação do anticorpo ao antígeno

CTLA-4 pode ser detectada por ligação do referido anticorpo marcado com repórter.

[0325] Em uma modalidade, a presente invenção se refere à utilização de um kit da presente invenção para ensaio in vitro e/ou detecção de CTLA-4 humano em uma amostra biológica.

7. EXEMPLOS

[0326] Os exemplos nesta Seção (isto é, Seção 6) são oferecidos a título ilustrativo e não como limitação.

7.1 EXEMPLO 1: CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS ANTICORPOS ANTI-CTLA-4

[0327] Esse exemplo descreve a caracterização de anticorpos que se ligam ao CTLA-4 humano. Em particular, esse exemplo descreve a caracterização de anticorpos que se ligam especificamente ao CTLA-4 humano e inibem a função do CTLA-4. A informação da sequência das regiões variáveis de tais anticorpos é fornecida na Tabela 4. Todos os anticorpos foram expressos como anticorpos IgG1 e analisados nos ensaios descritos abaixo.

7.1.1 LIGAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CTLA-4 A CÉLULAS QUE EXPRESSAM CTLA-4

[0328] Células Jurkat manipuladas para expressar constitutivamente o CTLA-4 humano (Promega) foram utilizadas para analisar a ligação de anticorpos anti-CTLA-4. Resumidamente, as células foram coradas a 5×10^5 células/poço utilizando 2 µg/ml de anticorpo em uma placa de 96 poços durante 30 minutos a 4 °C. As células foram lavadas duas vezes e incubadas durante 20 minutos a 4 °C com um anticorpo secundário anti-IgG humana (Thermo Scientific, Cat n° 31529). As células foram lavadas e suspensas em 50 µl de paraformaldeído a 2% (Alfa Aesar, Cat n° 43368) preparado em PBS. Os dados foram coletados com o BD FACS Canto II.

[0329] Como mostrado nas Figuras 1A-1G, todos os anticorpos anti-CTLA-4 testados ligaram-se a células que expressam CTLA-4.

7.1.2 EFEITO DO ANTICORPO ANTI-CTLA-4 EM PBMCs HUMANAS APÓS ESTIMULAÇÃO DA ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA A (SEA)

[0330] As atividades funcionais do anticorpo anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1) em PBMC humana primária foi avaliado após estimulação com Enterotoxina Estafilocócica A (SEA). Resumidamente, PBMCs criopreservadas foram estimuladas com 100 ng/ml do superantígeno de AAE (Toxin Technologies, Cat nº at101red) na ausência ou presença de 10 µg/ml de um anticorpo anti-CTLA-4 ou um anticorpo de controle de isótipo (IgG1) para 5 dias a 37 °C e CO₂ a 5%. As concentrações de IL-2 no sobrenadante da cultura foram analisadas por AlphaLISA (Perkin Elmer, Cat nº AL221F).

[0331] O anticorpo anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1) aumentou a produção de IL-2 em PBMCs humanas estimuladas com o superantígeno da ASE (Figura 2).

7.1.3 EFEITO DO ANTICORPO ANTI-CTLA-4 NA LINHA CELULAR REPÓRTER IL-2-LUCIFERASE

[0332] Em seguida, as atividades funcionais do anticorpo anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1) foram ainda analisadas utilizando um ensaio de repórter IL-2-luciferase. Resumidamente, uma linha de células T humanas (Jurkat) que expressou endogenamente CD3 e CD28 foi manipulada para expressar constitutivamente CTLA-4 da superfície celular e um gene repórter de luciferase dirigido por um promotor de IL-2. A linha celular repórter Jurkat foi co-cultivada com uma linha celular apresentadora de antígeno (Raji) que expressou CD80 e CD86 endogenamente e foi modificada para expressar um ativador de células T proprietário (Promega). O disparo do receptor de células T (TCR) (sinal 1) foi conseguido pelo ativador da célula T; e a sinalização coestimulatória (sinal 2) foi fornecida em trans por CD80 e CD86 expressa em células Raji. A sinalização de TCR na linha de células T Jurkat desencadeou expressão de IL-2, conduzindo à produção de luciferase, um marcador substituto para ativação de células T. A co-cultura dessas duas linhas celulares resultou no envolvimento do co-receptor inibitório CTLA-4 (expresso em células Jurkat) com ligantes naturais dos mesmos CD80 e CD86 (expressos em

células Raji) inibindo a ativação de células T, demonstrada pela falta de expressão de luciferase. Essa inibição foi aliviada com a adição de concentrações crescentes de anticorpos bloqueadores anti-CTLA-4. A expressão da luciferase foi quantificada utilizando o reagente Bio-Glo™ e os dados resultantes foram usados para determinar os valores de resposta de dobra (aumento dobra com AGEN1884.H3 (IgG1) comparado com um anticorpo de controle de isótipo (IgG1)).

[0333] Como mostrado na Figura 3, o anticorpo anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1) liberou, de forma dependente da dose, a inibição mediada por CTLA-4 das células T nesse ensaio de repórter IL-2-luciferase.

7.1.4 EFEITO DO ANTICORPO ANTI-CTLA-4 NA LINHA CELULAR REPÓRTER FIA_gIIIA

[0334] A capacidade do anticorpo anti-CTLA-4 para coativar CTLA-4 e sinalizar através da ativação de receptores Fc gama foi avaliada utilizando uma linha celular repórter expressando o receptor Fc gama IIIA (FcγRIIIA) (Promega). Resumidamente, as células Jurkat foram manipuladas para expressarem constitutivamente CTLA-4 humano na superfície celular. Essas células-alvo foram co-cultivadas com uma linha celular efetora (Jurkat) manipulada para expressar FcγRIIIA (variante V158) a montante de um elemento de resposta NFAT (RE) que impulsiona a expressão de luciferase de vagalume. Adicionou-se uma dose titulada de AGEN1884.H3 (IgG1) ou um anticorpo de controle de isótipo (IgG1) à co-cultura e incubou-se a 37 °C durante a noite. Engajamento simultâneo da AGEN1884.H3 pela linha celular alvo (ligação a CTLA-4 pela região Fab) e linha celular efetora (ligação a FcγRIIIA pela região Fc) desencadeia a ativação do gene repórter NFAT RE e a expressão da luciferase. No dia seguinte, o reagente Bio-Glo (Promega) foi adicionado à co-cultura, a luminescência foi medida pelo Leitor de Placas Multimodo EnVision (Perkin Elmer), e unidades de luz relativa (RLU) foram registradas para calcular os valores de resposta de dobra (aumento dobra com AGEN1884.H3 (IgG1) comparado com um anticorpo de controle de isótipo (IgG1)).

[0335] Quando ligado a células-alvo que expressam CTLA-4 humano na superfície da célula, o anticorpo IgG1 AGEN1884.H3 ativou sinalização de FcγRIIIA nas células efectoras (Figura 4).

7.2 EXEMPLO 2: CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CTLA-4 COM DIFERENTES REGIÕES Fc

[0336] Esse exemplo analisa o impacto da interação do receptor Fc/Fc sobre a atividade funcional dos anticorpos anti-CTLA-4. AGEN1884.H3 foi expresso como anticorpos nos quais a região IgG1 Fc compreende as mutações S239D/I332E, S239D/A330L/I332E ou L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L, numeradas de acordo com o sistema de numeração da EU, e testadas em ensaios funcionais descritos abaixo. O anticorpo AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/I332E) compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 24 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27. O anticorpo AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E) compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 25 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27. O anticorpo AGEN1884.H3 (IgG1 L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L) compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 26 e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 27. Para comparação, AGEN1884 foi também expresso como um anticorpo IgG1 de tipo selvagem, um anticorpo IgG1 que compreende mutações S239D/I332E ou S239D/A330L/I332E, numeradas de acordo com o sistema de numeração da EU, ou um anticorpo IgG1 afucosilado e testado em alguns ensaios funcionais.

7.2.1 LIGAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-CTLA-4 A CÉLULAS QUE EXPRESSAM CTLA-4

[0337] A ligação de anticorpos anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/I332E), AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E) e AGEN1884.H3 (IgG1 L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L) a células que expressam CTLA-4 foi

caracterizada de forma semelhante à descrita acima. Resumidamente, células Jurkat manipuladas para expressar CTLA-4 humano (Promega) foram coradas primeiro com 5 µg/ml de um anticorpo anti-CTLA-4 ou um anticorpo de controle de isótipo e, então, com um anticorpo secundário IgG anti-humano (Thermo Scientific, Cat n° 31529). As células foram analisadas usando BD FACS Canto II.

[0338] Como mostrado nas Figuras 5A-5D, anticorpos AGEN1884.H3 com diferentes regiões Fc, todos ligados a células que expressam CTLA-4 humano.

7.2.2 EFEITO DO ANTICORPO ANTI-CTLA-4 NA LIGAÇÃO DO LIGANTE AO CTLA-4 HUMANO

[0339] Nesse exemplo, foi testada a capacidade de um anticorpo anti-CTLA-4 Fc variante AGEN 1884.H3 (IgG1-S239D/A330E/I332E) bloquear a ligação entre o CTLA-4 humano e os ligantes dos mesmos, CD80 e CD86.

[0340] Resumidamente, as proteínas CD80-Fc e CD86-Fc recombinantes foram conjugadas com o fluorocromo Alexa Fluor 647 (Invitrogen, A20186). As células Jurkat foram transduzidas com trCTLA4 (domínio intracelular truncado) sob o controle do promotor EF1α, conforme descrito em Nakaseko et al. (J Exp Med. 20 de set de 1999; 190 (6): 765 a 774), produzindo assim uma linha celular que expressa constitutivamente o CTLA-4 humano na superfície celular. As células que expressam CTLA-4 foram incubadas com uma titulação da dose do anticorpo anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1-S239D/A330E/I332E), um anticorpo anti-CTLA-4 de referência ou um anticorpo de controle do isótipo (IgG1). As células foram então coradas com proteína CD80-Fc ou CD86-Fc marcada com fluorescência. Após a coloração, a fluorescência foi analisada usando o citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences). Gráficos de FACS foram analisados usando uma combinação de FACS DIVA e WEHI Weasel. Os valores foram plotados usando o software Graphpad Prism.

[0341] Conforme mostrado na Figura 6A, AGEN1884.H3 (IgG S239D/A330E/I332E) e o anticorpo de anti-CTLA-4 de referência bloquearam cada ligação entre CTLA-4 e CD80 humano de uma maneira dependente da dose, enquanto o anticorpo de controle do isótipo (IgG1) não teve efeito. Como mostrado na Figura 6B, AGEN1884.H3 (IgG S239D/A330E/I332E) e o anticorpo anti-CTLA-4 de referência bloquearam também, cada um, a ligação entre CTLA-4 e CD86 humano de um modo dependente da dose, enquanto o anticorpo de controle do isótipo (IgG1) não teve efeito. Esses dados mostram que AGEN1884.H3 (IgG S239D/A330E/I332E) funciona como um anticorpo bloqueador de ligante para CTLA-4.

7.2.3 EFEITO DE ANTICORPOS ANTI-CTLA-4 EM PBMCs HUMANOS APÓS ESTIMULAÇÃO DA ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCICA A (SEA)

[0342] Nesse exemplo, o impacto das regiões Fc sobre a atividade funcional dos anticorpos anti-CTLA-4 foi analisado usando o ensaio de estimulação de AAE descrito acima. Resumidamente, as PBMC humanas foram cultivadas in vitro com 100 ng/ml do peptídeo SEA (Toxin Technologies, Cat n° at101red) na ausência ou presença de anticorpos anti-CTLA-4 com diferentes regiões Fc ou um anticorpo de controle do isótipo. Após cinco dias, as concentrações de IL-2 no sobrenadante da cultura, um marcador de ativação das células T, foram medidas usando AlphaLISA (Perkin Elmer, Cat n° AL221F).

[0343] Como mostrado na Figura 7A, os três anticorpos AGEN1884.H3 contendo mutações nas regiões IgG1 Fc, que aumentaram a ligação a FcγRIIIA, estimularam mais secreção de IL-2 do que AGEN1884.H3 com uma região Fc de IgG1 de tipo selvagem.

[0344] Em estudos semelhantes, os anticorpos AGEN1884.H3 ou AGEN1884 com diferentes regiões Fc foram testados no ensaio de estimulação de AAE. A introdução de substituições S239D/I332E, S239D/A330L/I332E ou L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L na região IgG1 Fc

melhorou significativamente a atividade funcional de AGEN1884.H3 (Figura 7B). De um modo semelhante, AGEN1884 (IgG1 S239D/I332E), AGEN1884 (IgG1 S239D/A330L/I332E) e AGEN1884 afucosilado (IgG1) aumentaram a produção de IL-2 a concentrações substancialmente mais baixas em comparação com AGEN1884 com uma região Fc de IgG1 selvagem (Figura 7C).

7.2.4 EFEITO DOS ANTICORPOS ANTI-CTLA-4 NA FOSFORILAÇÃO DE ZAP70

[0345] Nesse exemplo, o impacto das regiões Fc sobre a atividade funcional dos anticorpos anti-CTLA-4 na sinapse células T apresentadoras de antígeno (APC) foi analisado usando um ensaio que mede a extensão da fosforilação da proteína tirosina quinase ZAP70, que é recrutada para TCR após o envolvimento de TCR, onde se torna fosforilado e facilita eventos de sinalização a jusante.

[0346] Resumidamente, PBMCs humanos foram incubados com uma concentração subótima de peptídeo SEA e 10 mg/ml de anticorpo de controle de isótipo (IgG1) ou os anticorpos anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1), AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou AGEN1884.H3 (IgG1 N297A). As células foram, então, incubadas a 37 °C durante 0 (pré) 1, 5, 10, 30 ou 60 minutos. No final da incubação, as células foram lisadas com tampão 1xRIPA frio suplementado com um coquetel inibidor de fosfatase/proteinase (Cell Signaling Technologies). Após clarificação do sobrenadante, a concentração de proteína foi quantificada utilizando análise de ácido bicinconínico (BCA) (Pierce Biotechnology). Os lisados celulares (20 mg/faixa) foram preparados em tampão de amostras Bolt LDS diluídos e aquecidos durante 10 minutos a 70 °C antes de serem carregados em geis Bis Tris 4-12% (Novex). As proteínas foram separadas em tampão MOPS 1x Bolt (ThermoFisher) e depois transferidas para uma membrana PVDF. Após o bloqueio com albumina de soro bovino a 5% (BSA, 1 hora), as amostras foram incubadas com anticorpo anti-fosfo-ZAP70 (Tyr493)/Syk (Tyr526) de coelho humano (Cell Signalling Technologies) em tampão de bloqueio durante a noite

a 4 °C. As membranas foram sondadas com conjugado HRP secundário de cabra anti-coelho e visualizadas com o reagente SignalFire ECL (Cell Signalling Technology). As imagens foram capturadas usando o sistema de imagem Chemidoc (BioRad). Como controle, a proteína total de ZAP70 foi avaliada após a remoção da membrana com o tampão de redução Western Blot Restore™ PLUS. A análise densitométrica de fosfo-ZAP70 normalizada para o total de ZAP70 foi realizada usando Image J (Wayne Rasband; Instituto Nacional de Saúde Mental, Bethesda, MD, EUA) e expressa como a dobra em relação às amostras tratadas com controle de isótipo que foram incubadas por 1 minuto.

[0347] Como mostrado nas Figuras 8A-8B, na amostra de anticorpo de controle do isótipo, a fosforilação de ZAP70 foi aumentada temporariamente dentro de dez minutos após a estimulação e rapidamente diminuída, sem níveis detectáveis após 15 minutos. Em contrapartida, a adição de anticorpos anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1) ou AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E) estendeu a ativação detectável de ZAP70 para 30 minutos, com a atividade mais pronunciada e abundância relativa observada com AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E).

7.2.5 EFEITO DE ANTICORPOS ANTI-CTLA-4 MURINOS NO CRESCIMENTO TUMORAL E DEPLEÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS INTRATUMORAIS EM UM MODELO DE CAMUNDONGO

[0348] Nesse exemplo, o impacto de regiões Fc sobre as atividades de depleção de células T reguladoras antitumorais e intratumorais (Treg) de anticorpos anti-CTLA-4 foi analisado usando um modelo de camundongo para câncer de cólon (camundongo portador de tumor CT26).

[0349] Resumidamente, 5x10⁴ células tumorais CT26 foram suspensas em 100 ml de PBS e injetadas subcutaneamente em camundongos BALB/cJ fêmeas com 6-8 semanas de idade (Jackson Laboratories). Após o enxerto a um volume tumoral de 50-80 mm³, os camundongos foram tratados com uma dose única de 100 µg de anticorpo anti-

CTLA-4 murino 9D9 (mIgG2a), uma variante silenciosa de Fc do anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A), uma variante Fc do anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a- S239D/A330L/I332E) ou um anticorpo de controle do isótipo (mIgG2a). As seqüências de aminoácidos para os anticorpos murinos testados são mostradas na Tabela 7.

Tabela 7 Sequências de aminoácidos de anticorpos anti-CTLA-4 de murino

Descrição	Sequência	SEQ ID NO
Anticorpo anti-CTLA-4 de murino (mIgG2a) cadeia pesada	EAKLQESGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFT DY YMNWWKQSHGKSLEWIGVINPYNGDTSYNQ KF KGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYY C ARYYGSWFAYWGQGTLVTVSSAKTTAPSVY PL APVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW NSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTW PSQ SITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCP APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSLPIVTCVV VD VSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHRED YN STLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKD LP APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTK KQV	49

Descrição	Sequência	SEQ ID NO
	TLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN TE PVLDSGSGSYFMYSKLRVEKKNWERNNSYSC SV VHEGLHNHHTTKSFSRTPG	
Anticorpo anti- CTLA-4 de murino (mIgG2a- S239D/A330L/133 2E) cadeia pesada	EAKLQESGPVLVKGASVKMSCKASGYTFT DY YMNWWKQSHGKSLEWIGVINPYNGDTSYNQ KF KGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYY C ARYYGSWFAYWGQGLTVTVSSAKTTAPSVY PL APVCGD TTGSSVT LGCLVKGYFPEPVTLTW NSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTW PSQ SITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCP APNLLGGPDVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVV VD VSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHRED YN STLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKD LP LPEERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTK KQ	50

Descrição	Sequência	SEQ ID NO
	VTLCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYK NT EPVLDSGGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYS CS VVHEGLHNHHTTKSFSRTPG	
Anticorpo anti- CTLA-4 de murino (mIgG2a-N297A) cadeia pesada	EAKLQESGPVLVKGASVKMSCKASGYTFT DY YMNWWKQSHGKSLEWIGVINPYNGDTSYNQ KF KGKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYY C ARYYGSWFAYWGQGLTVTVSSAKTTAPSVY PL APVCGD TTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTW NSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTW PSQ SITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPC KCP APNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVV VD VSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHRED YA STLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKD LP APIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTK KQV	51

Descrição	Sequência	SEQ ID NO
	TLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN TE PVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSC SV VHEGLHNHHTTKSFSRTPG	
Anticorpo anti- CTLA-4 de murino (mIgG2a) cadeia leve	DIVMTQTTLSPVSLGDQASISCRSSQSIVHS NG NTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVDP RF SGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGS HVP YTFGGGTKEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GG ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVL NS WTDQDSKDYSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSY TC EATHKTSTSPIVKSFNRNEC	52

[0350] Em um primeiro experimento, os camundongos tratados com anticorpos foram então medidos quinzenalmente para o crescimento do tumor. Como mostrado na Figura 9A, uma variante Fe do anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mostrada como mIgG2a-S239D/A330L/I332E) induziu a regressão completa em todos os camundongos portadores de tumor CT26 (oito dos oito camundongos testados). Em contrapartida, outras variantes do anticorpo 9D9 não conseguiram obter a mesma eficácia: o anticorpo 9D9 (mIgG2a) induziu regressões completas em três dos nove camundongos

testados e a variante silenciosa do anticorpo 9D9 (mIgG2a-N297A) falhou em induzir a regressão em qualquer um dos nove camundongos testados.

[0351] Em um segundo experimento, camundongos portadores de tumor CT26 foram tratados conforme descrito acima e depois sacrificados 0, 24, 72 ou 240 horas após o tratamento para coleta de tecido tumoral, nódulos linfáticos de drenagem de tumores e baços. Os tecidos coletados foram avaliados para expansão de Trp de FoxP3+ por citometria de fluxo. As suspensões de células únicas foram obtidas por dissociação mecânica seguida de filtração (70 µm de filtro de células). Para reduzir a ligação não específica, as células foram incubadas com um anticorpo bloqueador de FcγR (Biolegend) em tampão FACS (PBS, EDTA 2 mM, BSA a 0,5%, pH 7,2) durante 15 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então lavadas duas vezes em tampão FACS e manchadas para um painel de linhagem de CD3, CD4, CD8 e CD25, bem como um marcador vivo/morto fixável, durante 30 minutos a 4 °C. Para o delineamento de Treg, as amostras foram então lavadas duas vezes, fixadas, permeabilizadas e depois incubadas com um anticorpo anti-FoxP3 (FJK-16s) durante 30 minutos a 4 °C. As amostras foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences). Gráficos de FACS foram analisados usando uma combinação de FACS DIVA e WEHI Weasel. Como mostrado na Figura 9B, o anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a) e o anticorpo anti-CTLA-4 9D9 variante Fc (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) reduziram as quantidades de FoxP3+ Tregs intratumorais em comparação com o anticorpo de controle do isótipo, com o anticorpo anti-CTLA-4 9D9 variante Fc (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) diminuindo significativamente a quantidade de FoxP3+ Tregs intratumorais. A variante silenciosa Fc do anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A) não reduziu substancialmente a quantidade de Tregs FoxP3+ intratumorais em relação ao anticorpo de controle do isótipo. Nenhum dos grupos de tratamento apresentou alterações substanciais nas quantidades de leucócitos CD45+ intratumorais ou CD4+ não Tregs. O anticorpo anti-CTLA-4 9D9 variante Fc (mIgG2a-

S239D/A330L/I332E) induziu o maior aumento na relação CD8/Treg intratumoral ao longo do tempo, seguido pelo anticorpo 9D9 (mIgG2a), e depois pelo anticorpo variante silencioso Fc 9D9 (mIgG2a-N297A) e o anticorpo de controle do isótipo (mIgG2a).

[0352] Como mostrado na Figura 9C, o anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a), o anticorpo anti-CTLA-4 9D9 variante Fc (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) e a variante silenciosa Fc do anticorpo anti-CTLA 9D9 (mIgG2a-N297A) não teve efeito substancial nas quantidades de FoxP3+ Tregs de linfonodo que drena o tumor (TDLN) em comparação com o anticorpo de controle do isótipo. Similarmente, como mostrado na Figura 9D, o anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a), o anticorpo anti-CTLA-4 9D9 variante Fc (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) e a variante silenciosa Fc do anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a-N297A) não teve efeito substancial nas quantidades de FoxP3+ Tregs esplênico em comparação com o anticorpo de controle do isótipo.

7.2.6 EFEITO DE ANTICORPOS ANTI-CTLA-4 MURINOS EM COMBINAÇÃO COM UMA VACINA CONTRA TUMORES NO CRESCIMENTO DO TUMOR

[0353] Nesse exemplo, o efeito sobre o crescimento do tumor de uma combinação de anticorpos anti-CTLA-4 de murino e uma vacina contra o tumor HPV foi testado no modelo de camundongos com tumor singeneico HPV+ TC-1.

[0354] A linha celular TC-1 foi desenvolvida por co-transformação de células epiteliais pulmonares primárias (C57BL/6) com oncogenes c-Ha-ras e HPV-16 (E6/E7), conforme descrito em Lin et al. (1996, Cancer Res. 56 (1): 21 a 26). Para implantação tumoral, injetaram-se subcutaneamente 2 x 10⁵ células TC-1 em camundongos C57BL/6 fêmea com 6-8 semanas de vida (Jackson Laboratories). A cada um dos dias 5, 10 e 15 após a implantação do tumor, administraram-se aos camundongos 100 µg de anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a), um anticorpo anti-CTLA-4 9D9 variante Fc (mIgG2a-S239D/A330L/I332E), ou um anticorpo de controle de isótipo (mIgG2a), em combinação com uma dose de vacina de HPV (tumor de HPV+,

antígenos virais E6/E7) ou nenhum tratamento adicional. Cada dose de vacina contra o HPV continha 30 µg de proteína HSP (0,4 nM) complexada com o peptídeo do agrupamento de HPV (1,2 nM) e foi suplementada com 10 µg de adjuvante QS-21 Stimulon®. Após o tratamento, os camundongos foram avaliados quinzenalmente para o crescimento do tumor e foram sacrificados quando os tumores atingiram 2.000 mm³ ou após a ulceração.

[0355] Como mostrado na Figura 10, a eficácia antitumoral do anticorpo anti-CTLA-4 9D9 (mIgG2a) e do anticorpo anti-CTLA-4 9D9 variante Fc (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) apresentou cada melhoria quando administrados em combinação com a vacina contra o tumor do HPV. Esse efeito foi maior para o anticorpo anti-CTLA-4 variante Fc (mIgG2a-S239D/A330L/I332E). Em particular, o anticorpo anti-CTLA-4 9D9 variante Fc (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) induziu uma diminuição adicional perceptível no crescimento do tumor TC-1 quando combinado com a vacina contra o tumor HPV, em relação ao momento em que o anticorpo foi administrado como um agente único. Esse decréscimo adicional no crescimento do tumor foi superior àquele observado para as combinações do anticorpo 9D9 (mIgG2a) ou do anticorpo de controle do isótipo (mIgG2a) com a vacina contra o tumor do HPV.

7.2.7 CARACTERIZAÇÃO DE POPULAÇÕES DE CÉLULAS T EXPANDIDAS E ATIVADAS

[0356] Nesse exemplo, populações de células T expandidas e ativadas foram caracterizadas para expressão gênica e metilação CpG. Resumidamente, foram isoladas células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ naturais ou células T não reguladoras CD4⁺ CD25⁺ FOXP3 de sangue periférico de um dador humano saudável, expandido e ativado. As células T foram então caracterizadas quanto à expressão de FOXP3 e CTLA-4 por citometria de fluxo, e avaliadas quanto à estabilidade da linhagem pelo exame da metilação de CpG de DNA nas regiões CpG nos loci de FOXP3 e CTLA4. Como é conhecido na técnica, a hipometilação nesses sítios de CpG pode ser utilizada para delinear com precisão linhas de células T efetoras versus reguladoras (Waight et al., 2015, J. Immunol. 194 (3): 878 a 882). Os

PBMCs foram isolados via gradiente de Ficoll de camadas leucoplaquetárias saudáveis (Research Blood Components, LLC) e foram então enriquecidos para células T efectoras (Teffs) ou células T reguladoras naturais (Tregs) usando isolamento de esferas magnéticas (MACS, Miltenyi). As Teffs ou Tregs enriquecidas foram ativadas com microesferas CD3-CD28 (raão de 1:1 de microesfera:célula; Invitrogen) e com IL-2 humana recombinante por sete dias em meio RPMI suplementado com FBS a 10% inativado pelo calor a 37 °C e CO₂ a 5%. Após a estimulação, as células foram avaliadas quanto à expressão de FOXP3 e CTLA-4 através de citometria de fluxo. Para reduzir a ligação não específica, as células foram pré-incubadas com um anticorpo bloqueador de FcγR (Biolegend) em tampão FACS (PBS, EDTA 2 mM, BSA a 0,5%, pH 7,2) durante 15 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então lavadas duas vezes em tampão FACS e manchadas com um painel de linhagem de CD3, CD4, CD8, CD25, bem como um marcador de morte celular fixável, durante 30 minutos a 4 °C. Para avaliar a expressão da membrana CTLA-4, o manchamento de CTLA-4 foi realizada a 37 °C. Para manchamento intracelular de FOXP3 e CTLA-4, as amostras foram lavadas duas vezes, fixadas, permeabilizadas e incubadas com um anticorpo anti-FOXP3 (PCH101) e anticorpo anti-CTLA-4 (BNI3), respectivamente, durante 30 minutos a 4 °C. As amostras foram então lavadas duas vezes e analisadas usando o citômetro de fluxo LSRFortessa (BD Biosciences). Gráficos de FACS foram analisados usando uma combinação de FACS DIVA e WEHI Weasel. Para análise de metilação de CpG, o DNA total foi isolado de aproximadamente 1x10⁵ células T CD4⁺, Teffs ativadas ou Tregs ativadas e submetido a pirosequenciamento.

[0357] Como mostrado na Figura 11A, um alto nível de expressão FOXP3 foi detectado em Tregs ativados, bem como altos níveis de expressão de CTLA-4 intracelular e membrana. Em contraste, as Teffs ativadas mostraram níveis reduzidos de FOXP3, CTLA-4 intracelular e CTLA-4 em relação a Tregs ativadas. Em particular, observou-se substancialmente menor expressão de membrana CTLA-4 para Teffs ativadas em comparação com

Treg ativada. A Figura 11B mostra ainda que as Tregs ativadas também exibiram regiões de CpG de FOXP3 e CTL4 hipometiladas em comparação com Teffs intocadas e ativadas do mesmo doador.

7.2.8 EFEITO DOS ANTICORPOS ANTI-CTLA-4 NA CITOTOXICIDADE CELULAR DEPENDENTE DE ANTICORPO DE CÉLULAS T HUMANAS QUE EXPRESSAM CTLA-4

[0358] Nesse exemplo, o efeito do anticorpo anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1) ou variantes Fe sobre a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) de células T que expressam CTLA-4 humano foi avaliado utilizando microscopia de alto teor de ativação de caspase 3/7 para quantificar a atividade de ADCC.

[0359] Resumidamente, as células-alvo que expressam CTLA-4 foram co-cultivadas com células NK-92 expressando FcγRIIIA, após opsonização com 10 µg/ml de anticorpo anti-CTLA-4 ou variantes Fc do mesmo, conforme descrito abaixo. Em um primeiro experimento, as células Jurkat manipuladas para expressar constitutivamente CTLA-4 humano na superfície celular foram utilizadas como células-alvo. Células Jurkat expressando CTLA-4 foram geradas por transdução da linha de células Jurkat com 1xCTLA4 (domínio intracelular removido) sob o controle do promotor EF1α, conforme descrito em Nakaseko et al. (1999, J. Exp. Med. 190 (6): 765 a 774). Em um segundo experimento, utilizaram-se células T reguladoras e ativadas humanas ativadas primárias como células-alvo. Células-alvo expressando CTLA-4- e células NK-92 expressando FcγRIIIA-158V foram manchadas diferencialmente utilizando marcadores de células vivas vermelhas e azuis (Thermo Fisher) e co-cultivadas a uma razão de células de 1:1 (1,5x10³ células/poço em placas de 384 poços). As amostras foram tratadas com 10 µg/ml de AGEN1884.H3 (IgG1), AGEN1884.H3 (IgG1 N297A), AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), AGEN1884.H3 (IgG1 S267E/L328F), AGEN1884 afucosilado.H3 (IgG1) ou um anticorpo de controle de isótipo (IgG1). As amostras foram então avaliadas para a indução de apoptose ao longo do tempo por imagem confocal viva do substrato caspase 3/7, que fluoresce após

a clivagem por caspase ativada. Amostras de imagens foram adquiridas a cada 20 minutos por seis horas. A porcentagem de atividade de ADCC é medida como o número de células apoptóticas em relação à contagem total de células em cada condição.

[0360] Como mostrado na Figura 12A, o anticorpo AGEN1884.H3 variante Fc (IgG1 S239D/A330L/I332E), o anticorpo AGEN1884.H3 afucosilado e o anticorpo AGEN1884.H3 (IgG1) induziram, cada um, atividade ADCC substancialmente maior em células Jurkat manipuladas para expressarem CTLA-4 da superfície celular em relação a variante de AGEN 1884.H3 (IgG1 N297A), variante de AGEN1884.H3 (IgG1 S267E/L328F) e anticorpo de controle de isótipo (IgG1). O anticorpo AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E) variante Fc e o anticorpo AGEN1884.H3 afucosilado induziu maiores aumentos na atividade ADCC em comparação com o anticorpo AGEN1884.H3 (IgG1). Como mostrado na Figura 12B, o anticorpo AGEN1884.H3 variante Fc (IgG1 S239D/A330L/I332E) induziu os níveis mais elevados de ADCC em células T efetoras ativadas humanas primárias (painel da esquerda) e células T reguladoras humanas ativadas primárias (painel da direita), seguido de Anticorpo AGEN1884.H3 afucosilado e o anticorpo AGEN1884.H3 (IgG1) também induziu níveis ligeiramente mais elevados de ADCC em comparação com os controles. Os anticorpos restantes testados induziram pouca ou nenhuma atividade de ADCC em células T efetoras ou reguladoras. Notavelmente, o anticorpo AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E) variante Fc e o anticorpo AGEN1884.H3 induzira, cada um, ADCC substancialmente maior em células T reguladoras em comparação com células T efetoras.

7.2.9 EFEITO DOS ANTICORPOS ANTI-CTLA-4 EM COMBINAÇÃO COM UM ANTICORPO ANTI-PD-1 NA FUNCIONALIDADE DAS CÉLULAS T

[0361] Nesse exemplo, o efeito dos anticorpos anti-CTLA-4 em combinação com um anticorpo anti-PD-1 na função das células T humanas primárias foi examinado.

[0362] Resumidamente, os PBMCs foram isolados através de gradiente de Ficoll a partir de microesferas de dadores saudáveis (Research Blood Components, LLC) de dois doadores humanos. Esse experimento foi realizado duas vezes em PBMCs coletados de cada doador, para um total de duas repetições por doador. Para cada réplica, os PBMC isolados foram incubados durante quatro dias sob condições de cultura estimuladoras com uma titulação da dosagem do anticorpo anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1), um anticorpo anti-CTLA-4 da variante Fc AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E), ou um anticorpo de controle de isótipo (IgG1), em combinação com uma dose fixa (5 µg/ml) de um anticorpo antagonista anti-PD-1 de referência ou um anticorpo de controle do isótipo (IgG4). As condições de cultura estimulante foram definidas como células suspensas em meio RPMI, suplementadas com 100 ng/ml de superantígeno de SEA (Sigma-Aldrich), FBS a 10% inativado pelo calor a 37 °C e CO₂ a 5%. Após a incubação, os sobrenadantes livres de células foram analisados quanto à produção de IL-2 utilizando um imunoensaio AlphaLISA (Perkin-Elmer). Os dados foram coletados utilizando o Leitor de Placas Multilabel EnVision® (Perkin-Elmer) e a concentração de IL-2 foi determinada utilizando uma curva padrão de IL-2. Os valores foram interpolados e plotados usando o software Graphpad Prism.

[0363] Como mostrado nas Figuras 13A-13D, o anticorpo anti-CTLA-4 AGEN1884.H3 (IgG1) e o anticorpo anti-CTLA-4 da variante Fc AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E) induziram cada vez mais a produção de IL-2 em relação aos controles do isótipo ou referência apenas ao anticorpo anti-PD-1. A produção de IL-2 foi reforçada quando AGEN1884.H3 ou AGEN1884.O H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E) foi combinado com o anticorpo anti-PD-1 de referência. Quer administrado com anticorpo de controle de isótipo ou em combinação com anticorpo de referência anti-PD-1, o anticorpo anti-CTLA-4 de Fc variante AGEN1884.H3 (IgG1 S239D/A330L/I332E) induziu um maior aumento na produção de IL-2 em comparação com AGEN1884.H3

(IgG1). Esse efeito foi consistente em réplicas para o primeiro doador (Figuras 13A e 13B) e o segundo doador (Figuras 13C e 13D).

7.3 EXEMPLO 3: MAPEAMENTO DE EPÍTOPO DO ANTICORPO ANTI-CTLA-4

[0364] A interação do fragmento Fab de AGEN1884 (AGEN1884-Fab) com o domínio extracelular de CTLA-4 humano foi estudada por espectrometria de massa de troca de hidrogênio-deutério (HDX). O domínio extracelular de CTLA-4 sozinho ou em combinação com AGEN1884-Fab, em solução salina tamponada com fosfato a pH 7,4, foi diluído com um volume de dez vezes de tampão de marcação de óxido deutério e incubado durante períodos de tempo variáveis (0, 60, 300, 1.800 e 7.200 segundos) à temperatura ambiente. A troca de deutério por hidrogênio foi extinta adicionando um volume de cloridrato de guanidina 4 M, tampão TCEP 0,85 M (tris(2-carboxietil)fosfina) e o pH final foi de 2,5. As amostras foram então submetidas à digestão em pepsina/proteinase tipo XIII e análise por LC-MS. Os espectros de massa foram gravados no modo apenas MS. Para o cálculo da incorporação de deutério, os espectros de massa para um dado peptídeo foram combinados através do pico do cromatograma iônico extraído e a média ponderada m/z foi calculada. O aumento de massa da massa do peptídeo nativo (0 minuto) para a massa média ponderada corresponde ao nível de incorporação de deutério. As curvas de acúmulo de deutério durante o tempo de troca para todos os peptídeos foram plotadas para posterior análise e foram comparadas com o software HDEaminer.

[0365] A maioria dos peptídeos CTLA-4 exibiu níveis de deutério idênticos ou similares com e sem o Fab de CTLA-4 anti-humano presente. Verificou-se, no entanto, que vários segmentos peptídicos diminuíram significativamente a incorporação de deutério por ligação com Fab. Todos os resíduos deste parágrafo estão numerados de acordo com a SEQ ID NO: 33. Duas regiões, os resíduos 80-82 (QVT, SEQ ID NO: 39) e os resíduos 135-149 (YPPPYLGLIGNGTQI, SEQ ID NO:37), experimentaram forte proteção contra o deutério quando o CTLA-4 humano foi ligado a Fab. A diminuição mais forte

na absorção de deutério foi observada nos resíduos 140-141 (YL), que assim parecia ser uma característica principal do epítipo de AGEN1884 em CTLA-4. A inspeção das sequências de CTLA-4 de macaco humano e cynomolgus, ambas as quais AGEN1884 se liga fortemente (dados não mostrados), revela identidade de sequência quase completa nas duas regiões descritas acima, exceto uma substituição de metionina por leucina na posição 141 (Figura 14A). Em contraste, AGEN1884 não se liga a qualquer extensão significativa a CTLA-4 de rato ou camundongo (dados não mostrados) que diferem de CTLA-4 humano nos resíduos 140-143 (YLGI, SEQ ID NO: 34) em três de quatro posições (Figura 14A). Outros dados de seletividade mostram que AGEN1884 se liga com alta especificidade a CTLA-4 de macaco humano e cynomolgus e não a outros membros da família CD28 relacionados incluindo CD28, ICOS, BTLA e PD-1 (dados não mostrados). A comparação de sequências entre essas proteínas relacionadas mostra que todas as proteínas não CTLA-4 diferem nos resíduos 140-143 (YLGI, SEQ ID NO: 34) (Figura 14B), apoiando ainda a importância desse epítipo para a ligação de AGEN1884.

[0366] A invenção não deve ser limitada no escopo pelas modalidades específicas descritas no presente documento. De fato, várias modificações da invenção além daquelas descritas irão se tornar evidentes para os versados na técnica a partir da revelação anterior e Figuras anexas. Tais modificações destinam-se a cair dentro do escopo das reivindicações anexas.

[0367] Todas as referências (por exemplo, publicações ou patentes ou pedidos de patentes) citadas no presente documento são incorporadas no presente documento a título de referência em sua totalidade e para todos os propósitos na mesma extensão como se cada referência individual (por exemplo, publicação ou patente ou pedido de patente) fosse específica e individualmente indicado para ser incorporada a título de referência em sua totalidade para todos os propósitos.

[0368] Outras modalidades estão dentro das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado que especificamente se liga um CTLA-4 humano, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3 e uma região variável de cadeia leve que compreende regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que:

(a) CDRH1 compreende a sequência de aminoácidos de SYSMN (SEQ ID NO: 10);

(b) CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SSSSSSYIYYAXSVKG (SEQ ID NO: 18), em que X é E ou D;

(c) CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de VGLXGPFDI (SEQ ID NO: 19), em que X é F ou M;

(d) CDRL1 compreende a sequência de aminoácidos de RASQSVSRYL (SEQ ID NO: 15);

(e) CDRL2 compreende a sequência de aminoácidos de GASTRAT (SEQ ID NO: 16); e

(f) CDRL3 compreende a sequência de aminoácidos de QQYGSSPWT (SEQ ID NO: 17),

e em que as sequências de CDRH1, CDRH2 e CDRH3 do anticorpo não são SEQ ID NOs: 10, 11 e 13, respectivamente.

2. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que CDRH2 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

3. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado** pelo fato de que CDRH3 compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

4. Anticorpo isolado que especificamente se liga a CTLA-4 humano, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende

uma região variável de cadeia pesada que compreende regiões determinantes de complementaridade CDRH1, CDRH2 e CDRH3 e uma região variável de cadeia leve que compreende regiões determinantes de complementaridade CDRL1, CDRL2 e CDRL3, em que CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 e CDRL3 compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas em SEQ ID NOs: 10, 12, 14, 15, 16, e 17, respectivamente.

5. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

6. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, ou 100% idêntica a uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2 e 4-8.

7. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2 e 4-8.

8. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

9. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, ou 100% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

10. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 9, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região

variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

11. Anticorpo isolado que especificamente se liga a CTLA-4 humano, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 2-8.

12. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

13. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 12, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 23-26.

14. Anticorpo isolado que especificamente se liga a CTLA-4 humano, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve, em que a região variável de cadeia pesada e a região variável de cadeia leve compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas em SEQ ID NOs: 2 e 9; 3 e 9; 4 e 9; 5 e 9; 6 e 9; 7 e 9; ou 8 e 9, respectivamente.

15. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que a região variável de cadeia pesada e a região variável de cadeia leve compreendem as sequências de aminoácidos apresentadas em SEQ ID NOs: 8 e 9, respectivamente.

16. Anticorpo isolado que especificamente se liga a CTLA-4 humano, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada que tem uma sequência de aminoácidos derivada de uma sequência germinativa de IGHV3-21 humano, em que a região variável de cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos apresentada em SEQ ID NO: 14.

17. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 16, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia leve que tem uma sequência de aminoácidos derivada de uma sequência germinativa de IGKV3-20 humano.

18. Anticorpo isolado que especificamente se liga a CTLA-4 humano, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 23, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

19. Anticorpo isolado que especificamente se liga a CTLA-4 humano, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 24, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

20. Anticorpo isolado que especificamente se liga a CTLA-4 humano, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 25, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

21. Anticorpo isolado que especificamente se liga a CTLA-4 humano, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, e uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 27.

22. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12 ou 14 a 17, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região constante de cadeia pesada selecionada do grupo que consiste em IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, e IgA₂ humano.

23. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12 ou 14 a 17, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região constante de cadeia pesada IgG₁.

24. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 23, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região constante de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 28.

25. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de aminoácidos da região constante de cadeia pesada IgG₁ compreende mutações S239D/I332E, numeradas de acordo com o sistema de numeração EU.

26. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 25, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região constante de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 29.

27. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de aminoácidos da região constante de cadeia pesada IgG₁ compreende mutações S239D/A330L/I332E, numeradas de acordo com o sistema de numeração EU.

28. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 27, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região constante de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 30.

29. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que a sequência de aminoácidos da região constante de cadeia pesada IgG₁ compreende mutações L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L, numeradas de acordo com o sistema de numeração EU.

30. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 29, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região

constante de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 31.

31. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 23, **caracterizado** pelo fato de que a região constante de cadeia pesada IgG₁ é IgG₁ afucosilado.

32. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12 ou 14 a 17, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região constante de cadeia pesada de IgG humano que é uma variante de uma região constante de cadeia pesada de IgG humano de tipo selvagem, em que a região constante de cadeia pesada de IgG humano variante se liga a FcγRIIIA com uma afinidade maior que a região constante de cadeia pesada de IgG humano de tipo selvagem se liga a FcγRIIIA.

33. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado** pelo fato de que a região constante de cadeia pesada de IgG humano variante é uma região constante de cadeia pesada de IgG₁ humano variante.

34. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17 ou 22 a 33, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região constante de cadeia leve selecionada do grupo que consiste em Igκ e Igλ humano.

35. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 34, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região constante de cadeia leve Igκ.

36. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 35, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que compreende uma região constante de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 32.

37. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que se liga ao mesmo epítopo de CTLA-4 humano como um anticorpo que

compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 e uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

38. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que se liga a um epítopo situado em uma região de CTLA-4 humano que consiste em uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 34-39.

39. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que é um anticorpo humano.

40. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que é um anticorpo bispecífico.

41. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que é antagonístico a CTLA-4 humano.

42. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que desativa, reduz ou inibe uma atividade de CTLA-4 humano.

43. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 42, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que inibe a ligação de CTLA-4 humano a CD80 humano ou CD86 humano.

44. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 42, em que o anticorpo é **caracterizado** pelo fato de que induz a produção de IL-2 por células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) estimulada com enterotoxina estafilocócica A (SEA).

45. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que é conjugado a um

agente citotóxico, agente citostático, toxina, radionuclídeo ou etiqueta detectável.

46. Anticorpo isolado, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado** pelo fato de que o resíduo de aminoácido de N-terminal da região variável de cadeia pesada e/ou da região variável de cadeia leve do anticorpo foi convertido em piroglutamato.

47. Composição farmacêutica **caracterizada** pelo fato de que compreende o anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores e um excipiente ou carreador farmaceuticamente aceitável.

48. Polinucleotídeo isolado **caracterizado** pelo fato de que codifica uma cadeia pesada e/ou leve do anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 45.

49. Vetor **caracterizado** pelo fato de que compreende o polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 48.

50. Célula hospedeira recombinante **caracterizada** pelo fato de que compreende o polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 48 ou o vetor de acordo com a reivindicação 49.

51. Método de produção de um anticorpo que especificamente se liga a CTLA-4 humano, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que compreende cultivar a célula hospedeira de acordo com a reivindicação 50 de modo que o polinucleotídeo é expresso e o anticorpo é produzido.

52. Método de aumento de ativação de células T em resposta a um antígeno em um indivíduo, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz do anticorpo ou composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47.

53. Método de tratamento de câncer em um indivíduo, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar ao

indivíduo uma quantidade eficaz do anticorpo ou composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47.

54. Método, de acordo com a reivindicação 53, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um câncer metastático ou localmente avançado.

55. Método, de acordo com a reivindicação 53 ou 54, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um tumor sólido.

56. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 55, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um carcinoma de célula escamosa irressecável metastático ou localmente avançado, carcinoma adenosquamoso ou adenocarcinoma do colo do útero.

57. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 56, **caracterizado** pelo fato de que nenhuma terapia padrão está disponível para o câncer.

58. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 56, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é refratário a uma terapia padrão.

59. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 56, **caracterizado** pelo fato de que o câncer reincidiu após uma terapia padrão.

60. Método, de acordo com a reivindicação 58 ou 59, **caracterizado** pelo fato de que a terapia padrão compreende uma quimioterapia contendo platina.

61. Método, de acordo com a reivindicação 60, **caracterizado** pelo fato de que a terapia padrão compreende um duplete contendo platina.

62. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 61, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é positivo para HPV.

63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 55, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um câncer de pulmão de célula não pequena (NSCLC).

64. Método, de acordo com a reivindicação 63, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um NSCLC metastático.

65. Método, de acordo com a reivindicação 63 ou 64, **caracterizado** pelo fato de que o NSCLC não tem aberrações de tumor genômico de EGFR ou ALK.

66. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 63 a 65, **caracterizado** pelo fato de que o NSCLC não tem mutação de sensibilização de EGFR ou translocação de ALK.

67. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 63 a 66, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo não recebeu tratamento quimioterápico sistêmica anterior para o NSCLC.

68. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 55, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um carcinoma de célula escamosa cutânea (cSCC).

69. Método, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizado** pelo fato de que o câncer é um cSCC de Estágio IV.

70. Método, de acordo com a reivindicação 69, **caracterizado** pelo fato de que o cSCC é diagnosticado histológica ou citologicamente de acordo com a oitava edição do American Joint Committee on Cancer staging manual.

71. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 68 a 70, **caracterizado** pelo fato de que o cSCC não é curável com terapia de radiação.

72. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 71, **caracterizado** pelo fato de que a porcentagem de células tumorais em uma amostra do câncer que exibem expressão de

membrana detectável de PD-L1 é pelo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90%.

73. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 72, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é administrado como uma primeira terapia de câncer após o diagnóstico do câncer.

74. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 73, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é administrado como a primeira terapia de câncer após:

(a) diagnóstico de progressão de tumor que ocorreu apesar de tratamento prévio do câncer com uma terapia de câncer diferente; ou

(b) diagnóstico de toxicidade de uma terapia de câncer diferente,

opcionalmente em que o anticorpo é a segunda terapia de câncer administrada ao indivíduo.

75. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 75, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou composição farmacêutica é administrada por via intravenosa.

76. Método, de acordo com a reivindicação 75, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou composição farmacêutica é administrada por via intravenosa a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, ou 10 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez a cada duas semanas.

77. Método, de acordo com a reivindicação 75, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou composição farmacêutica é administrada por via intravenosa a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, ou 10 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez a cada três semanas.

78. Método, de acordo com a reivindicação 75, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou composição farmacêutica é

administrada por via intravenosa a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, ou 10 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez a cada quatro semanas.

79. Método, de acordo com a reivindicação 75, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou composição farmacêutica é administrada por via intravenosa a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, ou 10 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez a cada seis semanas.

80. Método, de acordo com a reivindicação 75, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou composição farmacêutica é administrada por via intravenosa a 0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, 6 mg/kg, ou 10 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez a cada doze semanas.

81. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 75, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou composição farmacêutica é administrada por via subcutânea.

82. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 75, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou composição farmacêutica é administrada por via intratumoral.

83. Método, de acordo com a reivindicação 82, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou composição farmacêutica é administrada por via intratumoral a 0,03 mg/kg, 0,1 mg/kg, ou 0,3 mg/kg, opcionalmente em um intervalo de uma vez a cada três semanas.

84. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 75, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo ou composição farmacêutica é entregue a um nódulo linfático de drenagem tumoral.

85. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 81 a 84, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é o anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 25 a 33.

86. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 85, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo é administrado como uma monoterapia.

87. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 52 a 85, **caracterizado** pelo fato de que compreende adicionalmente administrar um agente terapêutico adicional ao indivíduo.

88. Método, de acordo com a reivindicação 87, **caracterizado** pelo fato de que o agente terapêutico adicional é administrado sistemicamente.

89. Método, de acordo com a reivindicação 87 ou 88, **caracterizado** pelo fato de que o agente terapêutico adicional é um anticorpo anti-PD-1, opcionalmente em que o anticorpo anti-PD-1 é pembrolizumab ou nivolumab.

90. Método, de acordo com a reivindicação 89, **caracterizado** pelo fato de que o agente terapêutico adicional é pembrolizumab administrado a 200 mg a cada três semanas.

91. Método, de acordo com a reivindicação 87 ou 88, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo tem carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço e em que o agente terapêutico adicional é um anticorpo anti-EGFR, opcionalmente em que o anticorpo anti-EGFR é cetuximab,

opcionalmente em que o método compreende adicionalmente administrar um agente quimioterápico ao indivíduo, opcionalmente em que o agente quimioterápico é administrado sistemicamente, opcionalmente em que o agente quimioterápico é gemcitabina.

92. Método, de acordo com a reivindicação 87 ou 88, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo tem câncer de mama HER2+ e em que o agente terapêutico adicional é um anticorpo anti-HER2, opcionalmente em que o anticorpo anti-HER2 é trastuzumab,

opcionalmente em que o método compreende adicionalmente administrar um agente quimioterápico ao indivíduo,

opcionalmente em que o agente quimioterápico é administrado sistemicamente, opcionalmente em que o agente quimioterápico é gemcitabina.

93. Método, de acordo com a reivindicação 87 ou 88, **caracterizado** pelo fato de que o agente terapêutico adicional é um quimioterápico ou um agente de direcionamento de ponto de checagem.

94. Método, de acordo com a reivindicação 93, **caracterizado** pelo fato de que o agente de direcionamento de ponto de checagem é selecionado do grupo que consiste em um anticorpo anti-PD-1 de antagonista, um anticorpo anti-PD-L1 de antagonista, um anticorpo anti-PD-L2 de antagonista, um anticorpo anti-CTLA-4 de antagonista, um anticorpo anti-TIM-3 de antagonista, um anticorpo anti-LAG-3 de antagonista, um anticorpo anti-CEACAM1 de antagonista, um anticorpo anti-GITR de agonista, um anticorpo anti-OX40 de agonista e um anticorpo anti-CD137 de agonista.

95. Método, de acordo com a reivindicação 87 ou 88, **caracterizado** pelo fato de que o agente terapêutico adicional é um inibidor de indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO).

96. Método, de acordo com a reivindicação 95, **caracterizado** pelo fato de que o inibidor é selecionado do grupo que consiste em epacadostat, F001287, indoximod e NLG919.

97. Método, de acordo com a reivindicação 87 ou 88, **caracterizado** pelo fato de que o agente terapêutico adicional é uma vacina.

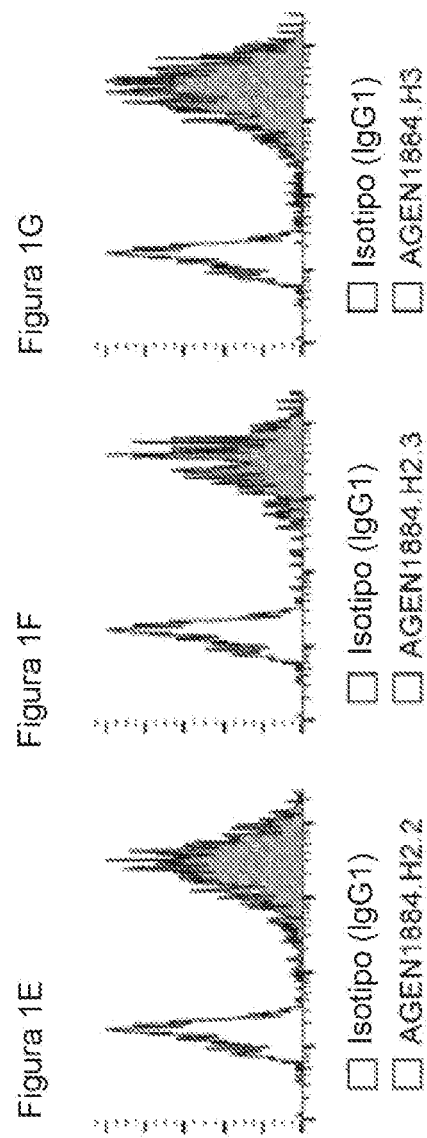
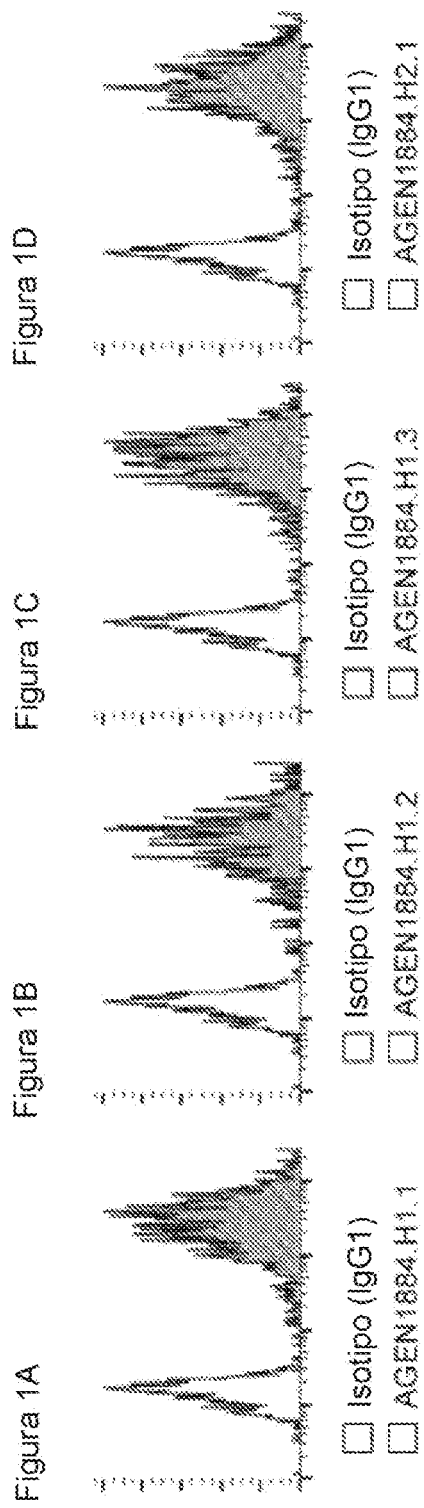
98. Método, de acordo com a reivindicação 97, **caracterizado** pelo fato de que a vacina compreende um complexo peptídico de proteína de choque térmico (HSPPC) que compreende uma proteína de choque térmico complexada com um peptídeo antigênico.

99. Método, de acordo com a reivindicação 98, **caracterizado** pelo fato de que a proteína de choque térmico é hsc70 e é complexada com um peptídeo antigênico associado a tumor.

100. Método, de acordo com a reivindicação 98, **caracterizado** pelo fato de que a proteína de choque térmico é proteína gp96 e

é complexada com um peptídeo antigênico associado a tumor, em que o HSPPC é derivado de um tumor obtido de um indivíduo.

101. Método de tratamento de uma doença infecciosa em um indivíduo, em que o método é **caracterizado** pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo uma quantidade eficaz do anticorpo ou composição farmacêutica de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 47.



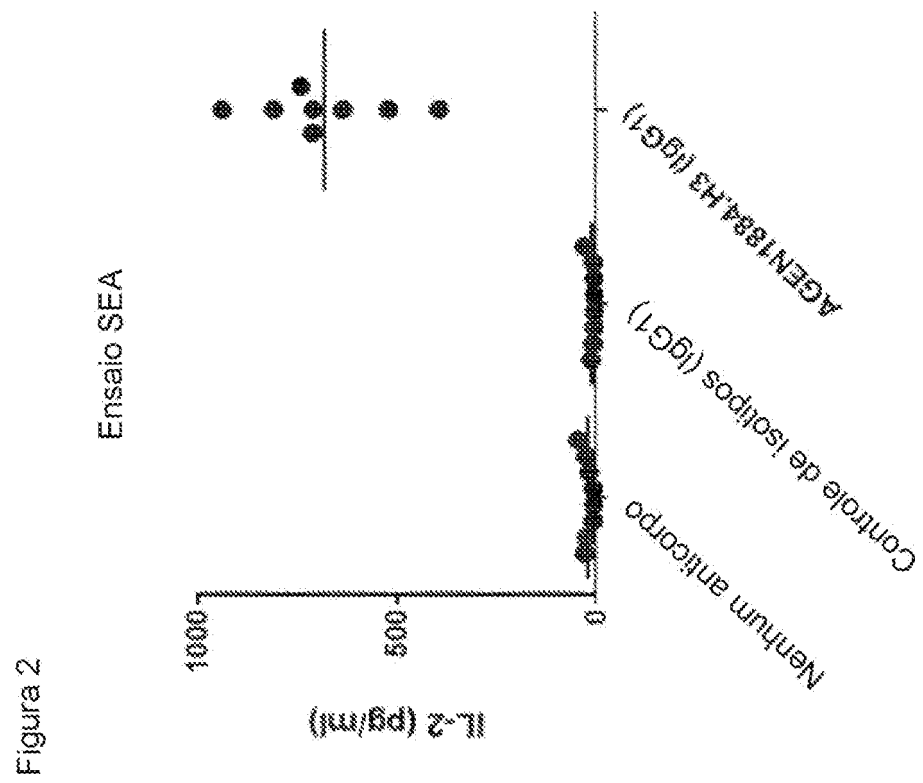


Figura 2

Figura 3

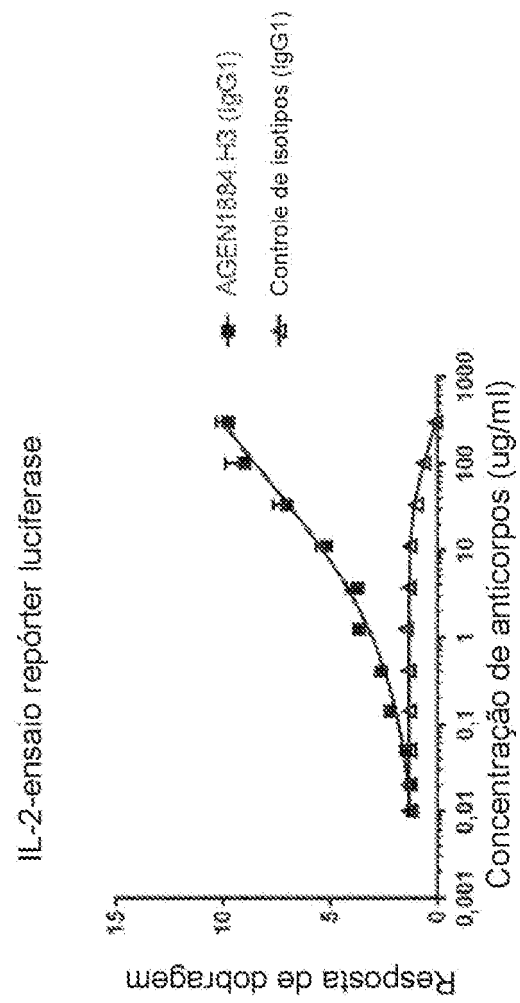


Figura 4

FcγRIIIa ensaio repórter

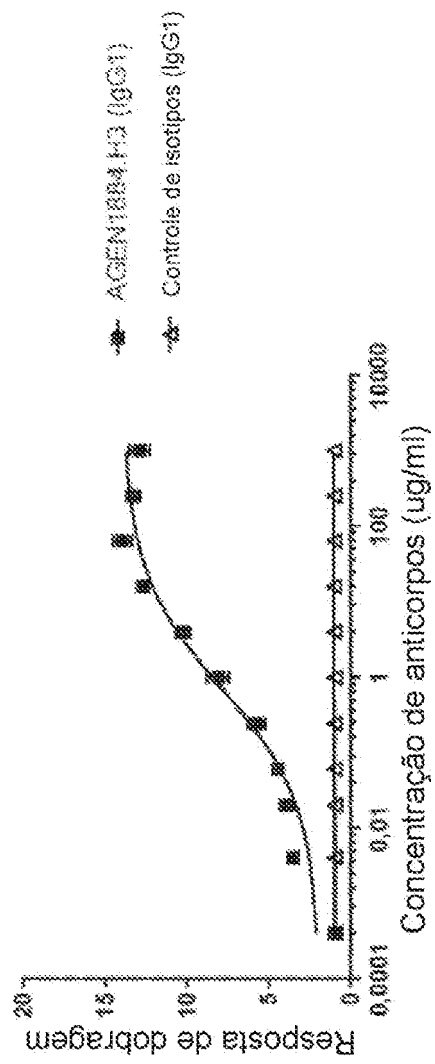


Figura 5A

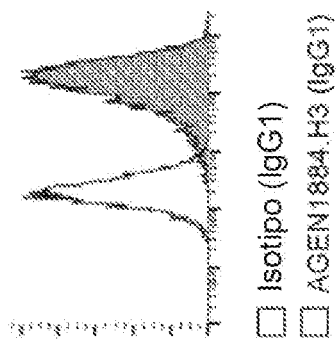


Figura 5B

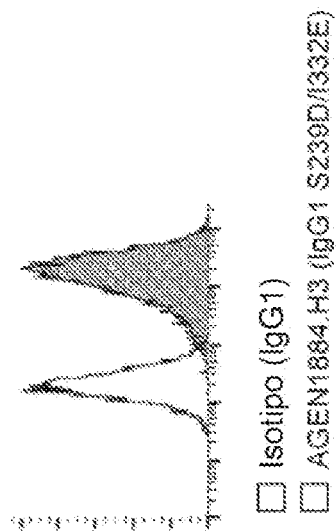


Figura 5C

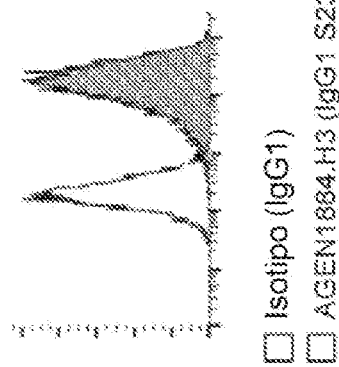


Figura 5D

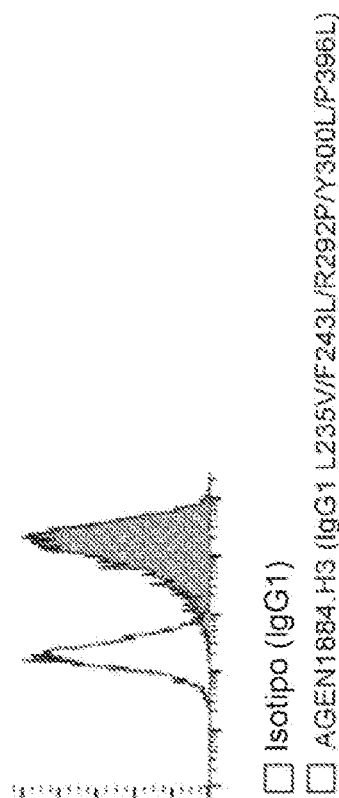


Figura 6A

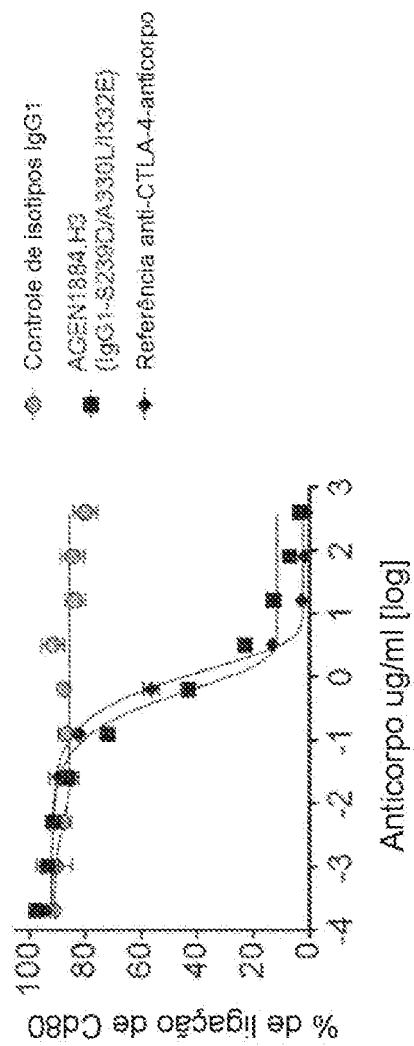
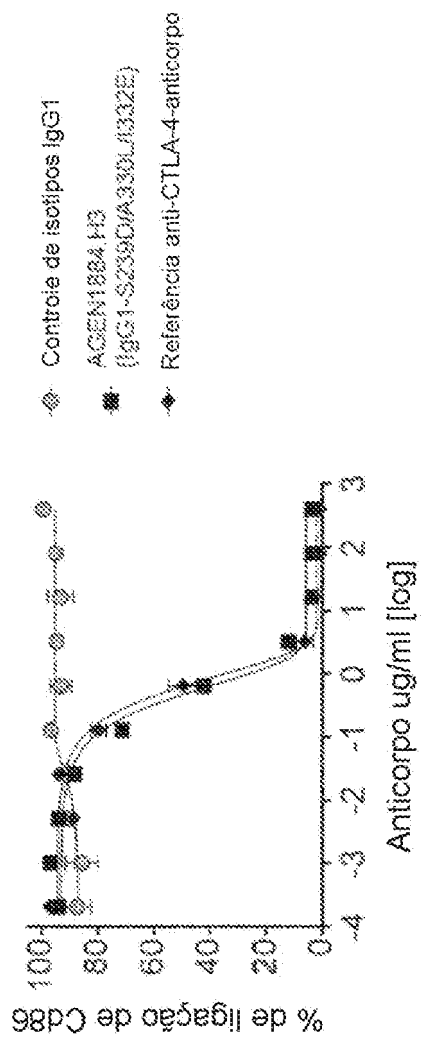


Figura 6B



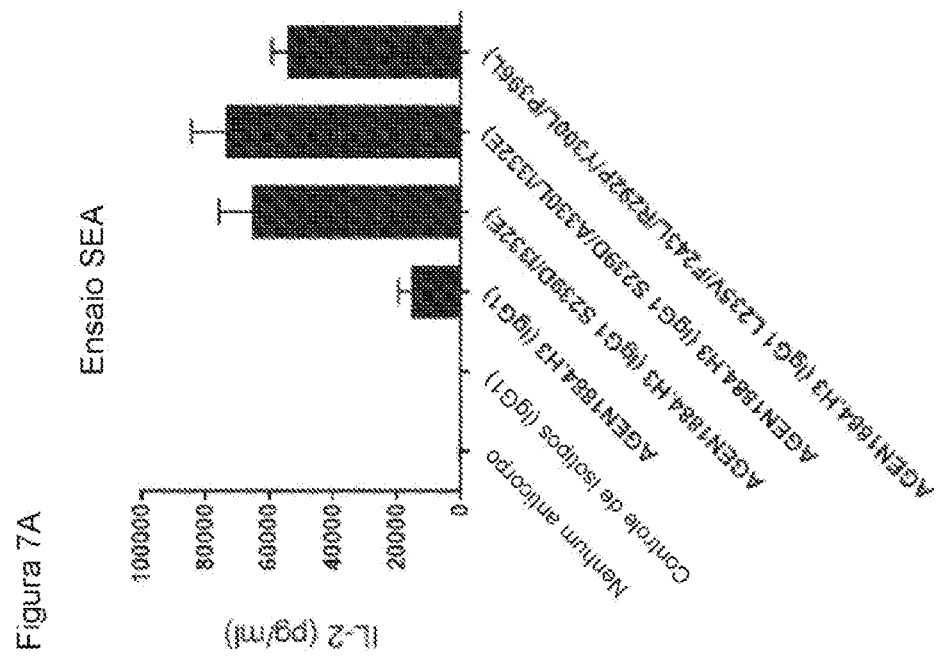


Figura 7B

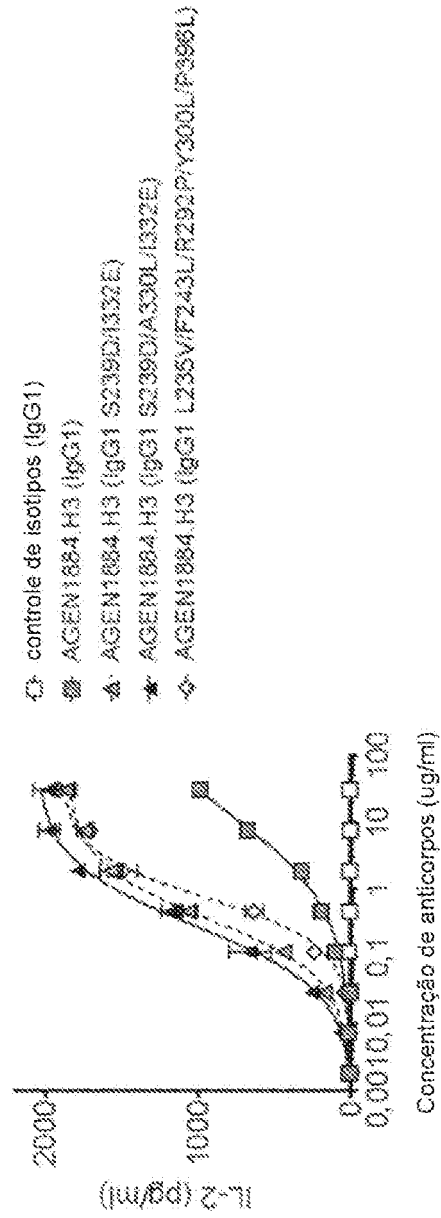


Figura 7C

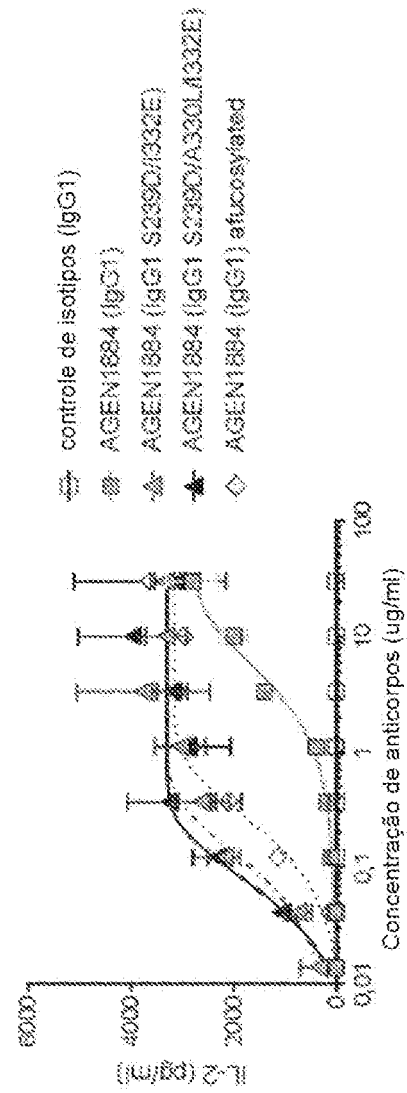


Figura 8A

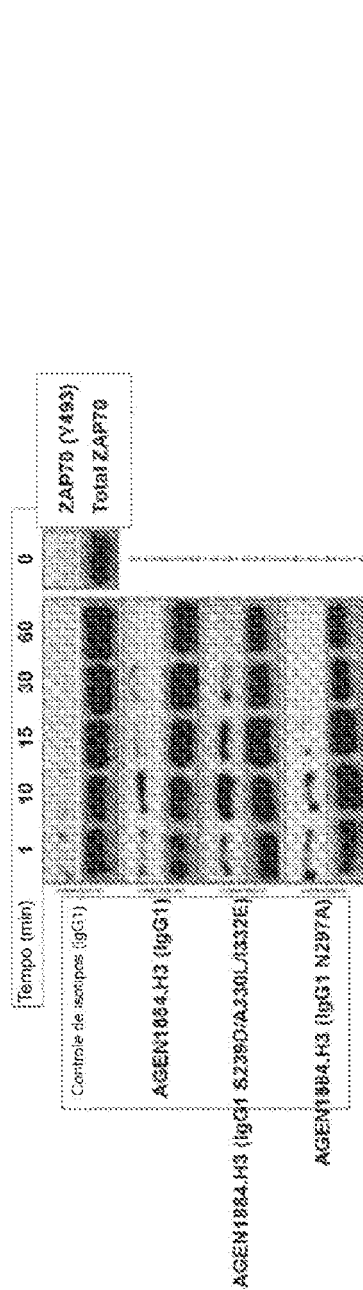


Figura 8B

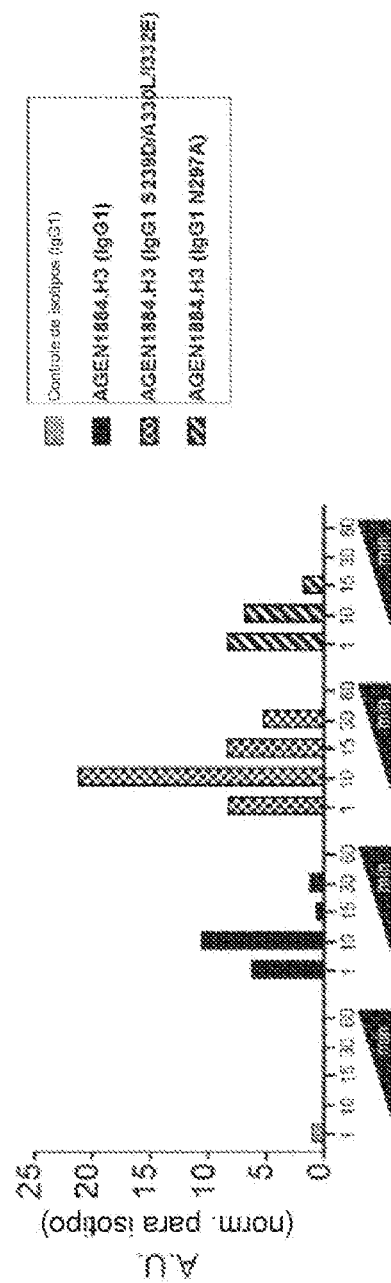


Figura 9A

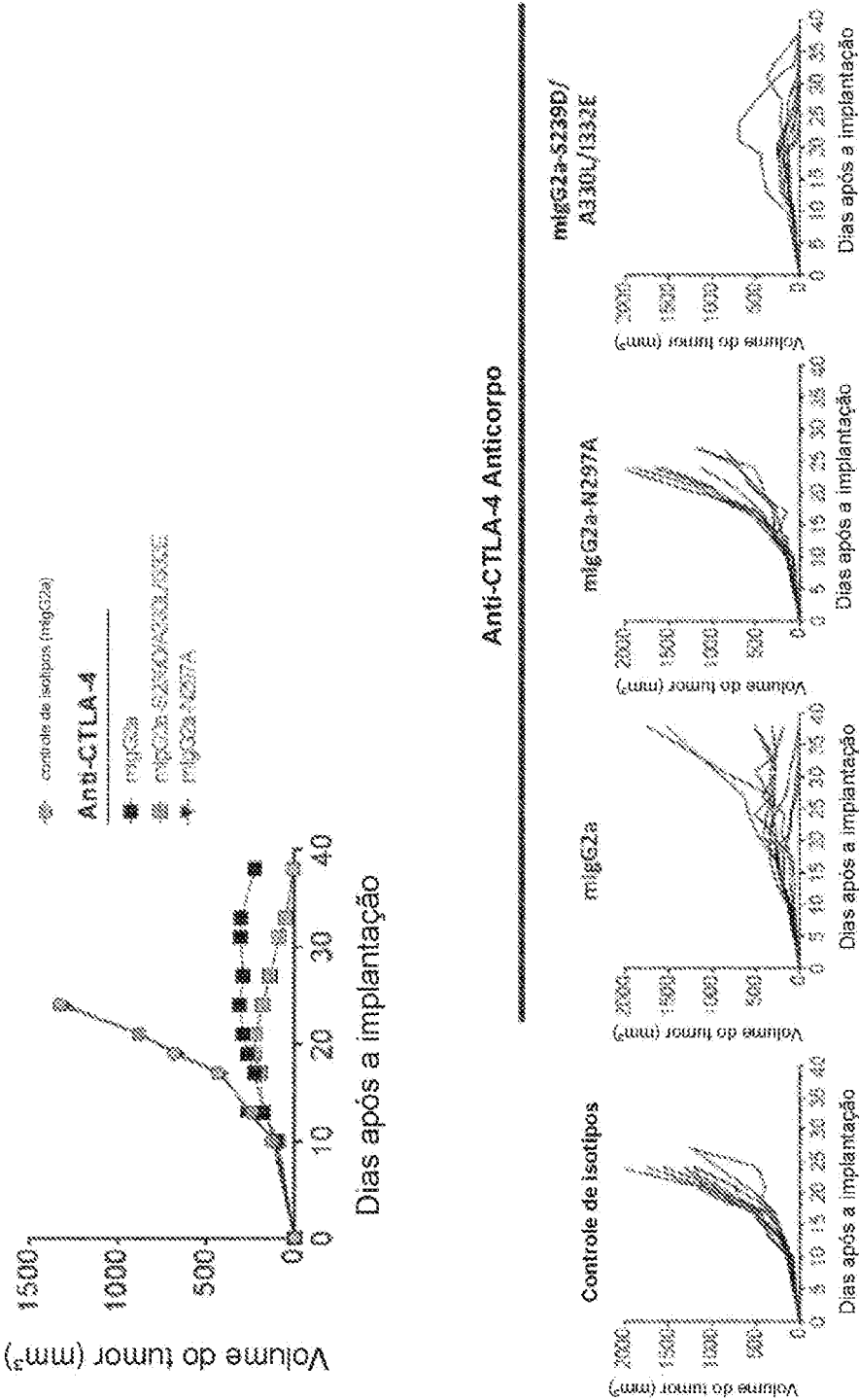


Figura 9B

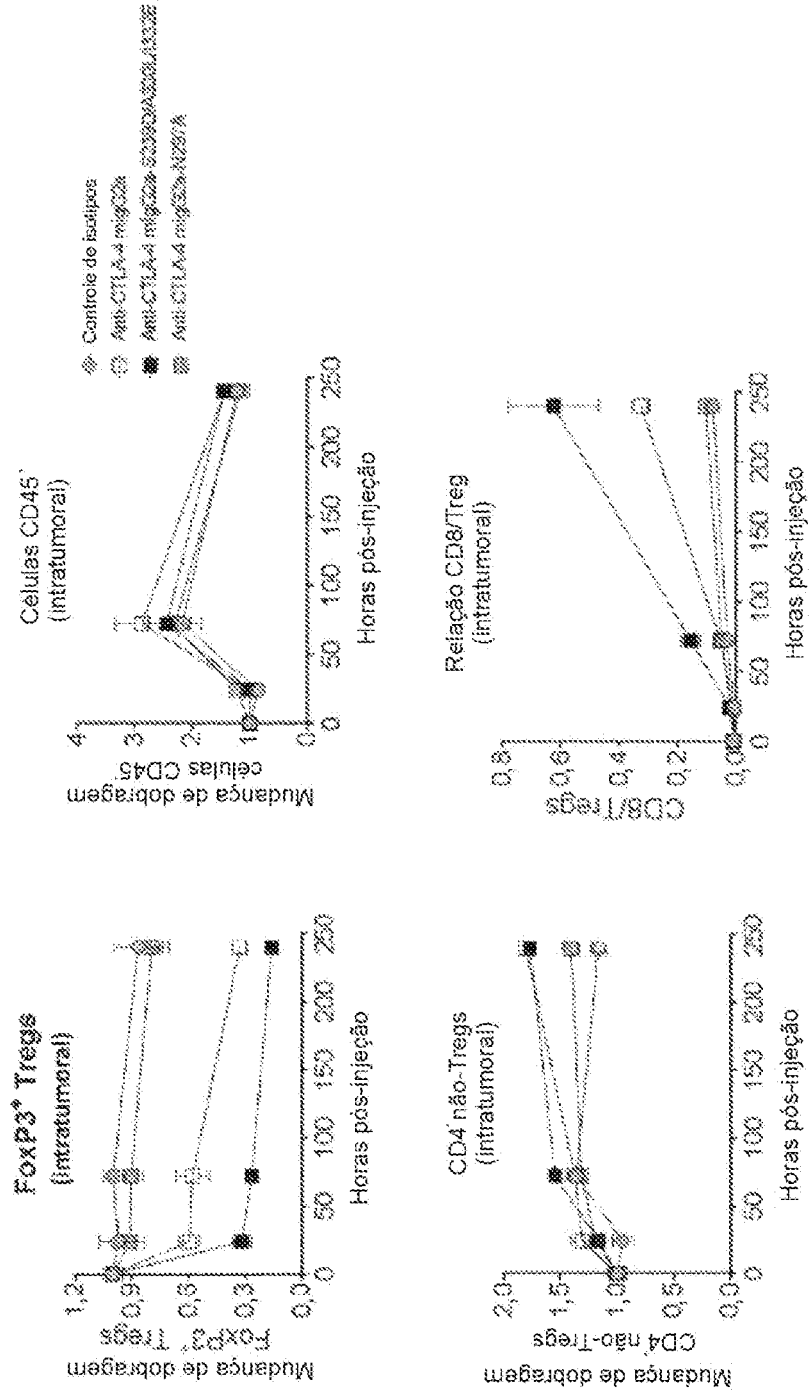


Figura 9C

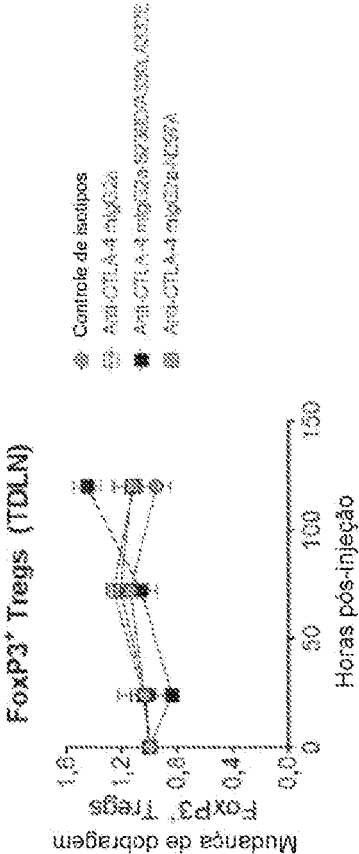


Figura 9D

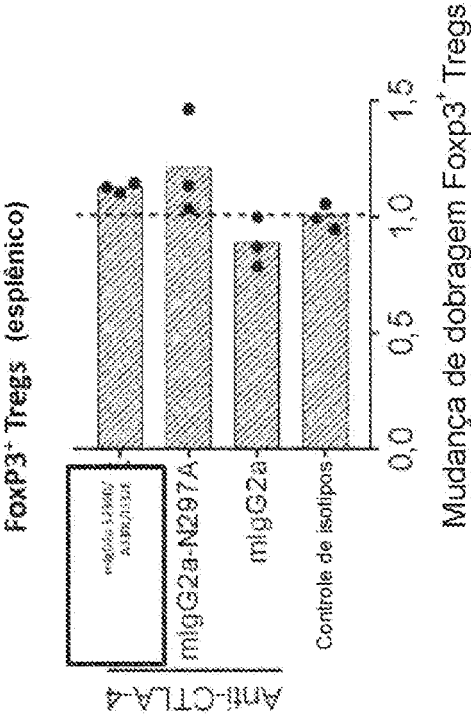


Figura 10

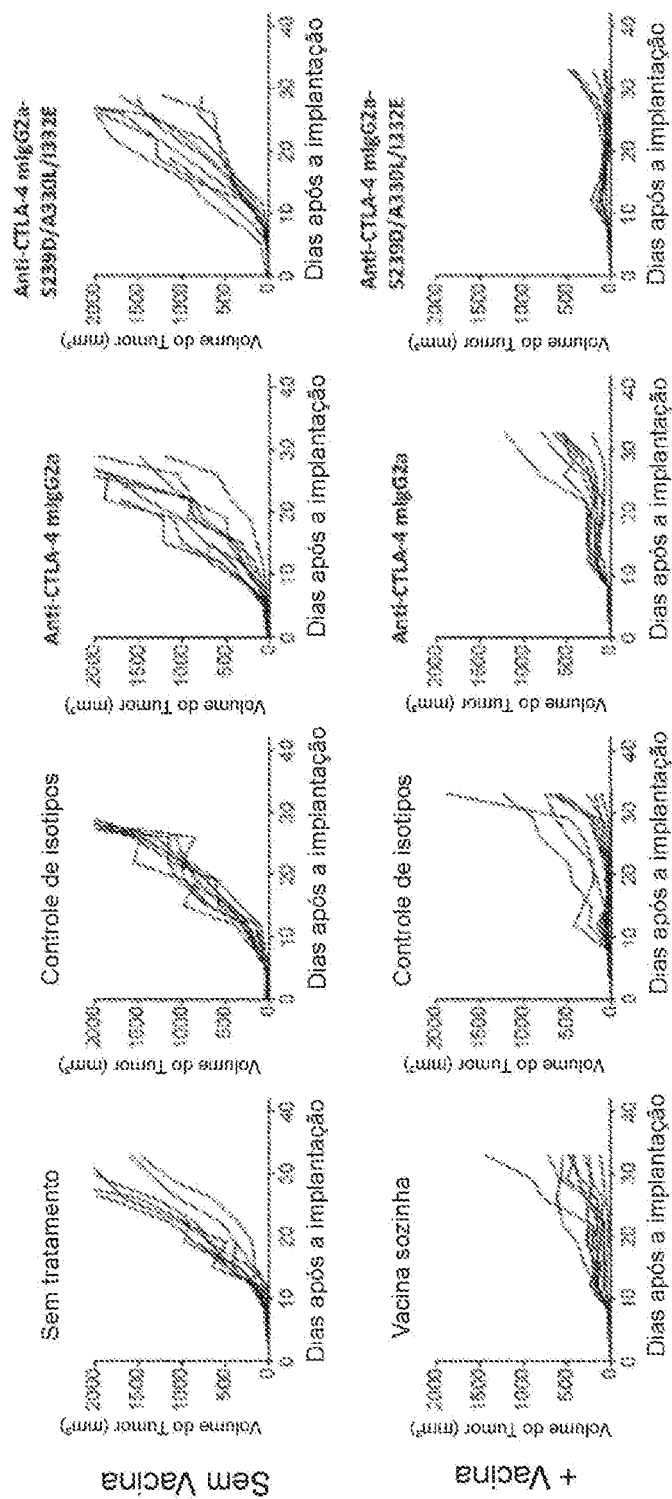


Figura 11A

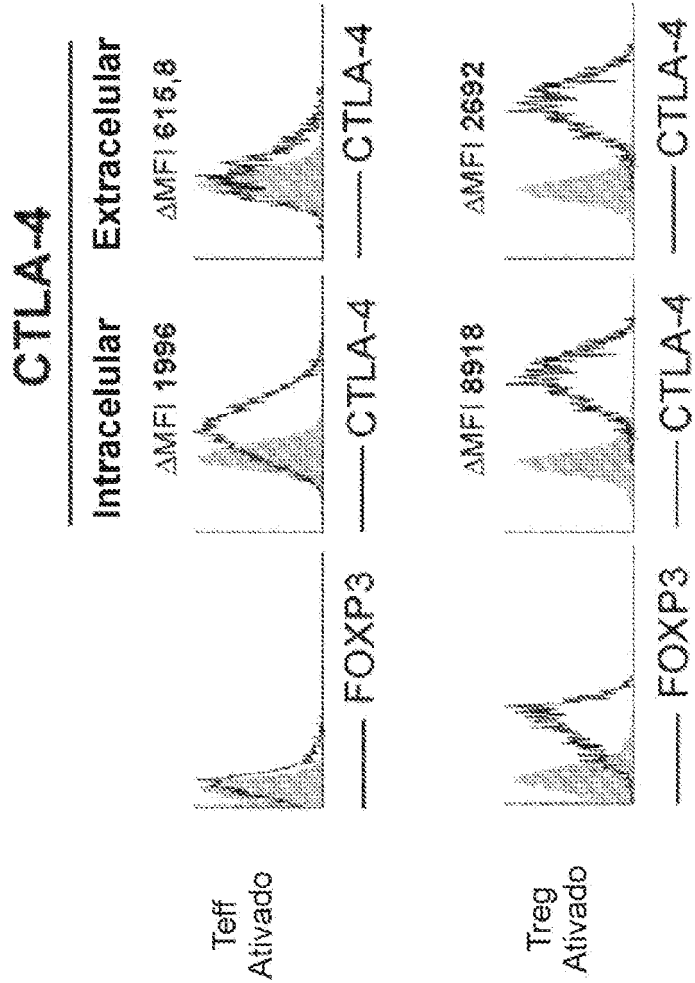


Figura 11B

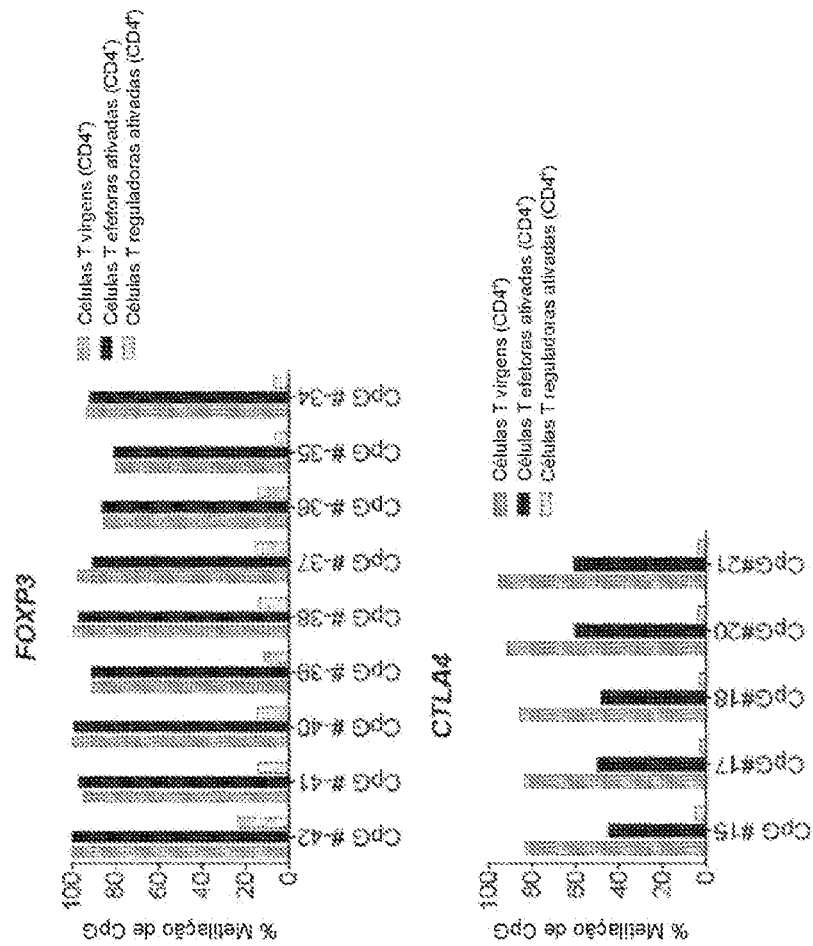


Figura 12A

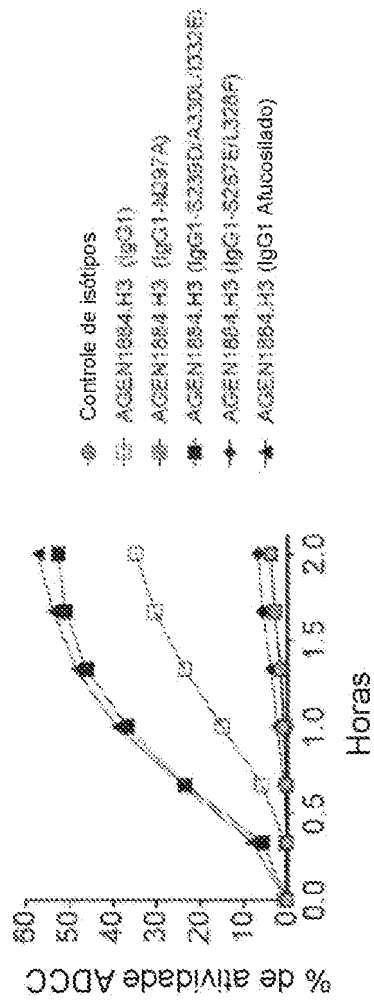


Figura 12B

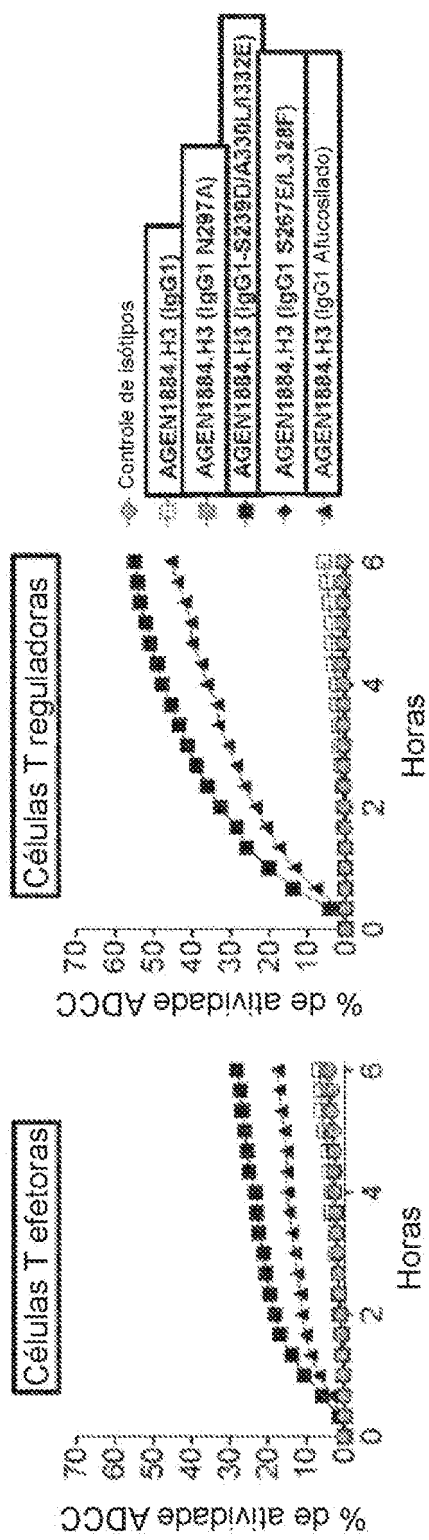


Figura 13A

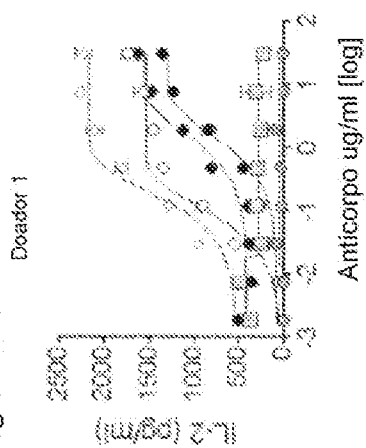


Figura 13C

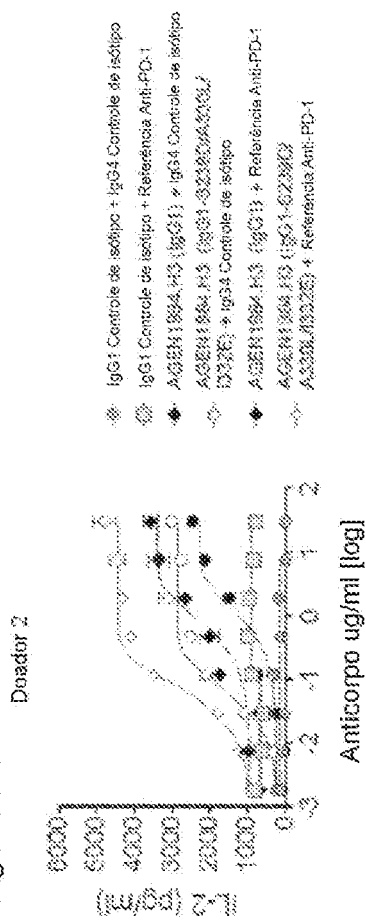


Figura 13B

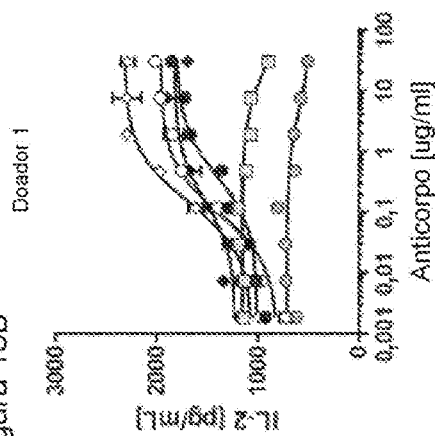


Figura 13D

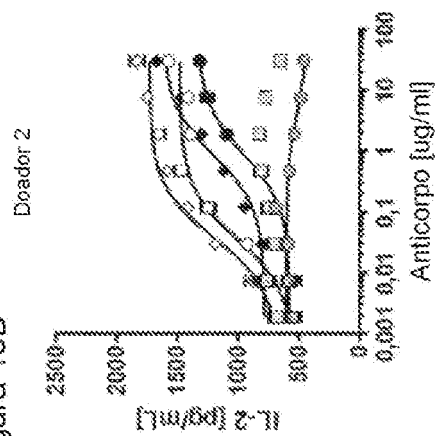


Figura 14A

[illegible]

Figura 14B

```

SP|P16410|CTLA4_HUMANO  MACLGTYRERKQAQINLATRIWPCITLLEFLLFIP--VFC-----KAMHVAQPAVYLA----- 40
TR|G7P188|G7P188_MACFA  MACLGTYRERKQAQINLATRIWPCITLLEFLLFIP--VFS-----KAMHVAQPAVYLA----- 40
SP|P10747|CD28_HUMANO   -----MKLLLLALN--LFFS--IQVTGNKILVQSP--MLV----- 30
SP|Q9Y6W8|ICGS_HUMANO   -----KESGLNY-----EF--LFCRLRIKVLGELINGSANYEMFI----- 32
SP|Q7Z6A9|BTLA_HUMANO   -----MKTLRANLGTGKLPWV-----FFLIPYLDIWNHIGNESCDYQLYIK 41
SP|Q15116|PDCCI_HUMANO  -----MQIPQAFWVYVNAVILQWRPQWELDSFD--RPNNEFTFSFALLVY----- 44
                                     *
SP|P16410|CTLA4_HUMANO  -----SSRGIASFVCEYASQSKA----TEVTVTVLRQADSQVTEVCAATYMMENE--LT 98
TR|G7P188|G7P188_MACFA  -----NSRGIASFVCEYASQSKA----TEVTVTVLRQADSQVTEVCAATYMMENE--LT 98
SP|P10747|CD28_HUMANO   -----AYUNAVNLSCKYISYNLFS----REFEASLNKKLDSA--VEVTVVIGNYSCQIQVY 79
SP|Q9Y6W8|ICGS_HUMANO   -----FUNGSVQLLCXYPD--IV----QQFKMQLLKGQ-----LLCDLKNKGSNTVS 76
SP|Q7Z6A9|BTLA_HUMANO   -----RQSEHSILAGDPFELECPVKEYCANRPHVTWCKLN--GF-----TCVKLEDRQ----- 86
SP|Q15116|PDCCI_HUMANO  -----TEGDNATFTTCFNTSESEFVNWYMSFGNQTK-----LAAPTEDR----- 86
                                     *
SP|P16410|CTLA4_HUMANO  FLEDSICT-----GTSSGNQVNLTI----QSLRAMDTGLNICKVVELMYPPFYILGIG----- 144
TR|G7P188|G7P188_MACFA  FLEDSICT-----GTSSGNQVNLTI----QGLRAMDTGLYICKVVELMYPPFYIMGIG----- 144
SP|P10747|CD28_HUMANO   SKTGFMCD-----GKLGNESVTFTYL----QNLVYMGTDIYFCKTEWNYPPFYLDNEK----- 127
SP|Q9Y6W8|ICGS_HUMANO   IKSLEFCH-----SQLSNNNSVSFTL----YNLHSHNANYFPCNLISIFDEPPEKVLIT----- 124
SP|Q7Z6A9|BTLA_HUMANO   -----ISWREKKNISFTFLLHFEFVLPMDNGSYKDSANFQSNL---IE----- 125
SP|Q15116|PDCCI_HUMANO  SQFGQDCREHVTQLPWGROFMSV---VBARNDSSGTLYLCHALSAISLAFKQIKESLFAELR 143
                                     *

```

Figura 14C

SP E16410 CTLA4_HUMANO	-NCTQIYVIDP-----RCPDPS-----DFLLNIIAAVSSGLFFYSFLLTAVSL--S--KML	190
TR G7FL88 G7FL88_MACFA	-NCTQIYVIDP-----RCPDPS-----DFLLNIIAAVSSGLFFYSFLLTAVSL--S--KML	190
SP E10747 CD28_HUMANO	SNCTIIHVCKK-----HLCPSLFFGSPKPFNVLVGVGLACYSLLVTIVAFI--LEWVR	190
SP Q9Y6W8 ICOS_HUMANO	--GQILHIYES-----GLCCQL-----KFWLPIGCAA--FYVVCILGCIL--ICWLI	165
SP Q7Z6A9 BTLA_HUMANO	SKSTILAVTDVKSASHPKDEMASR--FWLLYRLLFLGG-----LFLLTTTCFLCCLARR	180
SP Q15116 PDCD1_HUMANO	VTERHAHVPTA-----HPSPSPFAG--QFQTLVGVGVGGLGGLVLLVWVLAV--ICSRA	195
;		
SP E16410 CTLA4_HUMANO	KKRSP-----LFTGVYVVKMPTE-----PEC-ENQFQPYFIPIN-----	223
TR G7FL88 G7FL88_MACFA	KKRSP-----LFTGVYVVKMPTE-----PEC-ENQFQPYFIPIN-----	223
SP E10747 CD28_HUMANO	SKRER-----LLHSQYKMMTPRR-----PGPIKHYOPIAPPRO--FAAYRS-----	220
SP Q9Y6W8 ICOS_HUMANO	KKKYSSSVHDPNCEXNMKAVN-----TAKKRLTDVFL-----	199
SP Q7Z6A9 BTLA_HUMANO	HQCKQNELSDIAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGLYDNDPDLCFRMQDGS	240
SP Q15116 PDCD1_HUMANO	ARG-----TIG-----ARR-----TGQP-LKEDPSAVPVF--SVDYSELDFQWEKT	234
;		
SP E16410 CTLA4_HUMANO		
TR G7FL88 G7FL88_MACFA		
SP E10747 CD28_HUMANO		
SP Q9Y6W8 ICOS_HUMANO		
SP Q7Z6A9 BTLA_HUMANO	EVYSNPCLLENKP--GIYIASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASL-----CVRS--	289
SP Q15116 PDCD1_HUMANO	PEFPVPQVPEQTRYATIVFP-----SGMGTSSPARRGSAADGPRGAGFLKPEDGHCNWL	298

RESUMO**“ANTICORPOS ANTI-CTTLA-4 E MÉTODOS DE USO DOS MESMOS”**

A presente revelação fornece anticorpos que especificamente se ligam a CTLA-4 (por exemplo, CTLA-4 humano) e antagonizam função de CTLA-4. Também são fornecidas composições farmacêuticas que compreendem esses anticorpos, ácidos nucleicos que codificam esses anticorpos, vetores de expressão e células hospedeiras para produzir esses anticorpos, e métodos de tratamento de um indivíduo com o uso desses anticorpos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 193.370-1 Listagem de Sequências.txt
- Data de Geração do Código: 18/12/2019
- Hora de Geração do Código: 11:20:52
- Código de Controle:
 - Campo 1: 578C79715B9E1F93
 - Campo 2: A7FDABDD48FE8284