

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 091**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 31/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2006 E 06748745 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.05.2013 EP 1866339**

54 Título: **Moléculas de unión G1TR y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**25.03.2005 US 665322 P**

**03.06.2005 US 687265 P**

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

**29.11.2013**

73 Titular/es:

**G1TR, INC. (100.0%)  
55 Cambridge Parkway, Suite 102  
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**SMITH, L. MARY;  
SZYMANSKA, GRAZYNA;  
PONATH, PAUL;  
ROSENZWEIG, MICHAEL y  
PONTE, JOSE F.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 432 091 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Moléculas de unión GITR y usos de las mismas

Antecedentes de la Invención

5 Los elementos del factor de necrosis tumoral y la superfamilia del receptor TNF (TNFR) regulan diversas funciones biológicas, que incluyen proliferación, diferenciación, y supervivencia celular. Utilizando la exhibición diferencial para identificar los mRNA de célula T inducidos por la dexametasona de la hormona glucocorticoide sintética, Nocentini et al. ((1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:6216-6221997) identifica un cADN de ratón que codifica un elemento novedoso de la familia TNFR. El gen correspondiente se denomina GITR para el gen relacionado con la familia TNFR inducido por glucocorticoides (también conocida como TNFRSF18). Como otros TNFR, la proteína GITR  
10 predicha contiene repeticiones ricas en cisteína en el dominio extracelular. Adicionalmente, el dominio intracelular de GITR comparte homología significativa con aquellos TNFR humanos y de ratón, 4-1BB y CD27. Nocentini et al. ((1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:6216-6221997) demuestra que el gen GITR se induce en células T mediante dexametasona así como también mediante otros estímulos que activan la célula. La expresión GITR protege las células T de apoptosis inducida por el tratamiento con anticuerpos anti-CD3, pero no mediante otros agentes apoptóticos.  
15

Shimizu et al. ((2002) Nat Immunol 3:135-42) encuentra que el GITR se expresa predominantemente en células T reguladoras CD4+CD25+. Sin embargo, el GITR también se expresa en células T CD4+ y T CD8+ convencionales, y se mejora su expresión rápidamente después de activación. Los estudios In vitro han mostrado que el GITR cumple una función clave en la tolerancia periférica que esta mediada por estas células y aboga la función supresora de las células T reguladoras CD4+CD25+ (Shimizu et al. (2002) Nat Immunol 3:135-42; McHugh et al. (2002) Immunity 16: 311-23). El documento WO 03/006058 describe un anticuerpo que se une a y modula GITR. El anticuerpo encuentra uso en inmunoterapia y terapia y diagnóstico del cáncer.  
20

Sería de gran beneficio el desarrollo de agentes útiles para modular la señalización por medio de GITR.

Resumen de la Invención

25 La presente invención se define en la descripción y las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención proporciona moléculas de unión que se unen específicamente a GITR, por ejemplo, el GITR humano (hGITR), en células, tal como células T y células dendríticas. Las moléculas de unión de la invención se caracterizan mediante unión a hGITR con alta afinidad, son agonistas en la presencia de un agente de estimulación, por ejemplo, CD3, y abrogan la supresión de las células efectoras T (Teff) mediante las células reguladoras T (Treg).

30 La molécula de unión puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

La molécula de unión puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

35 La molécula de unión puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

La molécula de unión puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 58, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

La molécula de unión puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 59.

40 La molécula de unión puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 60, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

La molécula de unión puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 61, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

La molécula de unión puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 62, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

La molécula de unión puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 63, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

La invención caracteriza una molécula de unión que comprende los CDR mostrados en la SEQ ID NOs: 3, 4, 5, 6, 7, y 8, o una molécula de unión que comprende los CDR mostrados en la SEQ ID NOs: 3, 19, 5, 6, 7, y 8.

5 Un aspecto de la invención caracteriza una molécula de unión que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y que comprende adicionalmente una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. Otro aspecto de la invención caracteriza una molécula de unión que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66 y que comprende adicionalmente una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En más de una realización, la molécula de unión comprende las regiones de estructura principal de cadena ligera humanas o sustancialmente humanas y pesada humana. En otra realización, uno o más residuos de aminoácido de estructura principal humana se mutan en el residuo de aminoácidos de murino correspondiente. En otra realización, la región constante comprende una región constante de cadena pesada IgG2b. En otra realización, la región constante comprende una región constante de cadena pesada humana, por ejemplo, IgG1 humana. En otra realización, la molécula de unión se altera para reducir la función efectora y/o la glucosilación. En una realización, la molécula de unión se une al GTR humano. En una realización, la molécula de unión no induce apoptosis. En otra realización, la molécula de unión no bloquea la reacción de linfocitos mezclados principales. En todavía otra realización, la molécula de unión aboga la supresión de las células efectoras T mediante las células reguladoras T. En una realización, la molécula de unión modula la proliferación de célula T efectora. En una realización, la molécula de unión es de murino. En otra realización, la molécula de unión comprende una cadena pesada IgG2b de murino. En una realización, la molécula de unión es un anticuerpo humanizado. En una realización adicional, la molécula de unión es un anticuerpo quimérico. En todavía otra realización, la molécula de unión modula la actividad del GTR humano. En otra realización, la molécula de unión atenúa la degradación de I-KB en células T.

25 Otra realización de la invención caracteriza una molécula de unión que se une a GTR en células T humanas y células dendríticas humanas y tiene una constante de unión (Kd) de  $1 \times 10^{-9}$  o menos. En una realización, la molécula de unión aboga la supresión de las células efectoras T mediante las células reguladoras T. En otra realización, la molécula de unión es un anticuerpo humanizado.

30 Todavía otro aspecto de la invención caracteriza una composición que comprende una molécula de unión de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición comprende adicionalmente por lo menos un agente terapéutico adicional para tratar cáncer en un sujeto. En una realización, la composición comprende adicionalmente por lo menos un agente terapéutico adicional para tratar una infección vírica en un sujeto. En otra realización, la composición comprende adicionalmente por lo menos un antígeno neoplásico para tratar cáncer en un sujeto. En todavía otra realización, la composición comprende adicionalmente por lo menos un antígeno de un agente patológico.

La molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para abrogar la supresión de las células efectoras T mediante las células reguladoras T, que comprende poner en contacto las células inmunes humanas con la molécula de unión de la invención de tal manera que se aboga la supresión de las células efectoras T mediante las células reguladoras T.

40 La molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para modular el receptor de célula T que induce la señalización en una célula T efectora, que comprende poner en contacto una célula con la molécula de unión de la invención, de tal manera que se modula la señalización del receptor inducido por célula T en una célula T efectora. En una realización, el método modula la degradación de I-KB. En una realización, la célula T es una célula Th1. En otra realización, la célula T es una célula CD4+. En todavía otra realización, la célula T es una célula CD8+.

45 La molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para mejorar una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula con la molécula de unión de la invención de tal manera que se mejora una respuesta inmunológica en un sujeto.

50 La molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para tratar cáncer en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula con la molécula de unión de la invención de tal manera que el cáncer se trata en un sujeto. En una realización, el tipo de cáncer se selecciona del grupo que consiste de: cáncer pancreático, melanomas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer bronquial, cáncer colorectal, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer del sistema nervioso central o cerebro, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer esofágico, cáncer cervical, cáncer uterino o endometrial, cáncer de la cavidad oral o faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer testicular, cáncer del tracto biliar, cáncer de apéndice o de

intestino delgado, cáncer de glándula salivar, cáncer de glándula tiroide, cáncer de glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma, y cáncer de tejidos hematológicos.

5 La molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para tratar una infección provocada por un agente patogénico en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula con la molécula de unión de la invención, de tal manera que la infección provocada por un agente patogénico se trata en un sujeto. En una realización, el agente patogénico es un virus, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste de: hepatitis tipo A, hepatitis tipo B, hepatitis tipo C, influenza, varicela, adenovirus, herpes simplex tipo I (HSV I), herpes simplex tipo II (HSV II), peste bobina, rinovirus, virus ECHO, rotavirus, virus sincitial respiratorio, virus del papiloma, virus papova, citomegalovirus, equinovirus, arbovirus, hantavirus, virus coxsackie, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la rubeola, virus de polio, virus de inmunodeficiencia humana tipo I (VIH I), y virus de inmunodeficiencia humana tipo II (VIH II), cualquier picomaviridae, enterovirus, caliciviridae, cualquiera del grupo de virus Norwalk, togavirus, tal como alfavirus, flavivirus, coronavirus, virus de la rabia, virus de Marburgo, virus de ébola, virus parainfluenza, ortomixovirus, bunyavirus, arenavirus, reovirus, rotavirus, orbivirus, virus de leucemia de célula T humana tipo I, virus de leucemia de célula T humana tipo II, virus de inmunodeficiencia del simio, lentivirus, poliomavirus, parvovirus, virus Epstein Barr, virus de herpes 6 humano, virus herpes cercopitecina 1 (virus B), y poxvirus. En una realización, el método se utiliza para tratar una infección vírica crónica.

20 En otra realización, el agente patogénico es una bacteria, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste de: Neisseria spp, Streptococcus spp, S. mutans, Haemophilus spp., Moraxella spp, Bordetella spp, Mycobacterium spp, Legionella spp, Escherichia spp, Vibrio spp, Yersinia spp, Campylobacter spp, Salmonella spp, Listeria spp., Helicobacter spp, Pseudomonas spp, Staphylococcus spp., Enterococcus spp, Clostridium spp., Bacillus spp, Corynebacterium spp., Borrelia spp., Ehrlichia spp, Rickettsia spp, Chlamydia spp., Leptospira spp., Treponema spp.

La molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para modular la función de GITR que comprende poner en contacto el GITR humano con la molécula de unión de la invención en la presencia de un agente inmunoestimulador de tal manera que se modula la función de GITR.

25 Se caracterizan aquí las siguientes secuencias de CDR: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, y SEQ ID NO: 8. En una realización, la composición comprende adicionalmente por lo menos un agente terapéutico adicional para tratar cáncer en un sujeto. En otra realización, la molécula de unión comprende por lo menos un CDR derivado de la molécula de unión 6C8. En otra realización, la molécula de unión comprende por lo menos dos CDR derivados de la molécula de unión 6C8. En otra realización, la molécula de unión comprende por lo menos tres CDR derivados de la molécula de unión 6C8. En otra realización, la molécula de unión comprende por lo menos cuatro CDR derivados de la molécula de unión 6C8. En otra realización, la molécula de unión comprende por lo menos cinco CDR derivados de la molécula de unión 6C8. En otra realización, la molécula de unión comprende por lo menos seis CDR derivados de la molécula de unión 6C8.

35 Otro aspecto de la invención caracteriza una molécula de unión que comprende los seis CDR mostrados en la SEQ ID NOs: 3, 4 o 19, 5, 6, 7, y 8.

40 Todavía otro aspecto de la invención caracteriza una molécula de unión que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y que comprende adicionalmente una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En una realización, una molécula de unión comprende las regiones de estructura principal de cadena ligera humana o sustancialmente humana y pesada humana. En otra realización una molécula de unión de la invención comprende las regiones de estructura principal humana en las que uno o más residuos de aminoácidos de estructura principal humana se retromutan en el residuo de aminoácidos de murino correspondiente o se mutan en otro residuo de aminoácido. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, una región constante de cadena pesada IgG2b. En todavía otra realización, la molécula de unión se une al GITR humano (hGITR). En una realización, la molécula de unión no induce apoptosis. En otra realización, la molécula de unión no bloquea la reacción de linfocitos mezclados principales. En todavía otra realización, la molécula de unión aboga la supresión de las células efectoras T mediante las células reguladoras T. En una realización, la molécula de unión mejora la proliferación de célula T efectora. En otra realización, la molécula de unión neutraliza la actividad del GITR humano. En todavía otra realización, la molécula de unión atenúa la degradación de I-KB en células T.

En una realización, la invención caracteriza una molécula de unión que se une a GITR en células T humanas y células dendríticas humanas y tiene una constante de unión (Kd) de  $1 \times 10^{-9}$  o menos. En una realización, la molécula de unión aboga la supresión de las células reguladoras T. En otra realización, la molécula de unión es de murino o comprende CDR de murino. En una realización adicional, la molécula de unión comprende una cadena pesada

IgG2b. En una realización, la molécula de unión es un anticuerpo humanizado. En una realización adicional, la molécula de unión es un anticuerpo quimérico.

5 La molécula de unión de la invención se puede emplear en una composición que comprende la molécula de unión de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición comprende adicionalmente por lo menos un agente terapéutico adicional para tratar cáncer en un sujeto.

La molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para abrogar la supresión de las células efectoras T mediante las células reguladoras T, que comprende poner en contacto las células inmunes humanas con la molécula de unión de la invención de tal manera que se abroga la supresión de las células reguladoras T.

10 La molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para modular el receptor de célula T que induce la señalización en una célula T efectora, que comprende poner en contacto una célula con la molécula de unión de la invención, de tal manera que se modula la señalización del receptor inducido por célula T en una célula T efectora. En una realización, el método modula la degradación de I-KB. En una realización, la célula T es una célula Th1.

15 La molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para mejorar una respuesta inmunológica en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula con la molécula de unión de la invención de tal manera que se mejora una respuesta inmunológica en un sujeto.

20 La molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para tratar cáncer en un sujeto, que comprende poner en contacto una célula con la molécula de unión de la invención de tal manera que se trata el cáncer en un sujeto. En una realización, el tipo de cáncer se selecciona del grupo que consiste de: cáncer pancreático, melanomas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer bronquial, cáncer colorectal, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer del sistema nervioso central o cerebro, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer esofágico, cáncer cervical, cáncer uterino o endometrial, cáncer de la cavidad oral o faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer testicular, cáncer del tracto biliar, cáncer de apéndice o de intestino delgado, cáncer de glándula salivar, cáncer de glándula tiroide, cáncer de glándula suprarrenal, osteosarcoma, condrosarcoma, y cáncer de tejidos hematológicos.

25 La molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para inhibir la función de GITR que comprende poner en contacto el GITR humano con la molécula de unión de la invención en la presencia de un agente de estimulación de tal manera que se inhibe la función de GITR.

30 Se caracteriza aquí una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 9, que comprende opcionalmente una secuencia líder. Se caracteriza aquí una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 67, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

35 Se caracteriza aquí una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 10, que comprende opcionalmente una secuencia líder.

40 Se caracteriza aquí una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica por lo menos un CDR seleccionado del grupo que consiste de: SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 65, y SEQ ID NO: 13. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica por lo menos dos CDR derivados de la molécula de unión 6C8. En otra realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica por lo menos tres CDR derivados de la molécula de unión 6C8.

45 Se caracteriza aquí una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica por lo menos un CDR seleccionado del grupo que consiste de: SEQ ID NO: 14 SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica por lo menos dos CDR derivados de la molécula de unión 6C8. En otra realización, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica por lo menos tres CDR derivados de la molécula de unión 6C8.

50 Se caracteriza aquí una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de nucleótidos mostrados en la SEQ ID NOs: 11-16 y SEQ ID NO: 65.

5 Se caracteriza aquí un vector de expresión recombinante que comprende las moléculas de ácido nucleico mencionadas anteriormente. En una realización, se caracteriza un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de unión de la invención. También se caracteriza aquí una célula anfitriona en la que se ha introducido el vector de expresión recombinante. También se caracteriza aquí un método para producir una molécula de unión que une el GITR humano, que comprende cultivar una célula anfitriona en un medio de cultivo hasta que una molécula de unión que une el GITR humano se produce por la célula.

Breve Descripción de los Dibujos

10 La Figura 1 describe una transferencia SDS-PAGE de moléculas de unión GITR humanas y de ratón purificadas. Se cargan doce microgramos de proteína por pozo.

La Figura 2 describe una cromatografía de exclusión de tamaño (SE-HPLC) de la molécula de unión GITR humana purificada. Se inyecta cincuenta microgramos de proteína en la columna SE-HPLC en un índice de flujo de 0.6 ml/min. La pureza de las moléculas de unión mediante SE-HPLC produce una población de moléculas de unión en las que 99.8 % está en forma monomérica y 0.2 % de agregados.

15 La Figura 3 describe un análisis FACS de células L-M (fibroblasto de ratón) transfectadas con el gen GITR que se tiñen con 50 ml del fluido sobrenadante de las células de hibridoma que expresan GITR. La molécula de unión GITR tiñe las células transfectadas GITR pero no las células L-M no transfectadas.

La Figura 4 describe un análisis FACS que demuestra que el GITR se expresa principalmente en linfocitos activados. Las moléculas de unión 6C8 tiñen los linfocitos CD4+, CD8+, CD25+ y tiñen muy débilmente las células CD103+.

20 La Figura 5 describe una curva de saturación de la unión de la molécula de unión 6C8 que se evalúa mediante titulación de 6C8 marcado con biotina en linfocitos activados por CD3.

La Figura 6 es una gráfica que muestra que la molécula de unión 6C8 es coestimuladora para los linfocitos T que se estimulan con OKT3 sub-óptimo (anti-CD3; 0.01 mg/ml) y se incuban con anti-CD28, o anti-GITR. También se utiliza un isotipo de control (IgG2b).

25 Las Figuras 7A y 7B son gráficas que demuestran que la molécula de unión 6C8 no induce apoptosis. Los linfocitos se activan con PHA durante 3 días antes de la adición de 10 mg/ml de YTH655 (un anticuerpo anti-CD2 conocido por inducir apoptosis en los linfocitos activados; Friend, P., et al. (1987) Transplant. Proc. 19:4317), 6C8, o un isotipo de control (IgG2b). Se mide la apoptosis mediante conteos de viabilidad celular (A) y teñido con annexina V (B) y se mide la apoptosis mediante citometría de flujo.

30 La Figura 8 es una gráfica que demuestra que la molécula de unión 6C8 no bloquea una reacción de linfocito mezclado principal (MLR). Los linfocitos de los donantes alogénicos se mezclan en la presencia de TRX1 (CD4 anti-humano), 6C8 o MOPC (un isotipo de control para TRX1) en diversas concentraciones. Las células se incuban durante 3 días y se pulsan con 3H-timidina 18 horas antes que se cosechen y cuenten las células.

35 La Figura 9 es una gráfica que demuestra que la molécula de unión 6C8 bloquea la supresión de las células efectoras T inducida por células Treg. Se agregan células CD4+/CD25+ a células CD4+/CD25- en diversas relaciones. Las células se estimulan con anti-CD3 y anti-CD28 unido a placa. En relaciones de 1:1 se presenta inhibición de la proliferación de las células CD4+/CD25-. La adición de 6C8 en dos diluciones diferentes es capaz de bloquear la supresión de las células efectoras T CD4+ inducida por las células reguladoras T CD4+/CD25+.

40 La Figura 10 es una gráfica que demuestra que la molécula de unión 6C8 es co-estimuladora incluso cuando las células T se estimulan con anti-CD3 en la ausencia de anti-CD28. Las células CD4+/CD25+ se incuban con células CD4+/CD25- en diferentes relaciones celulares. Las células se estimulan con solo anti-CD3 unido a placa. Se agrega 6C8 a las células y bajo estas condiciones es co-estimulador.

La Figura 11 es una gráfica que demuestra el efecto de anti-GITR en la degradación de I-kB en células T activadas CD3 T.

45 La Figura 12 es una gráfica que demuestra el efecto de anti-GITR en fosforilación I-kB en células T activadas CD3.

La Figura 13 es una gráfica que demuestra el efecto de anti-GITR en la degradación I-kB, en CD3 más células T activadas CD28.

La Figura 14 es una gráfica que demuestra el efecto de anti-GITR en fosforilación I-kB, CD3 más células T activadas CD28.

La Figura 15 es una gráfica que demuestra que 6C8 y los epítomos únicos que reconocen el anticuerpo R&D Systems (Minneapolis, MN). El ensayo de competición se realiza en OKT3 y con linfocitos activados A. Se utiliza un mg/ml de 6C8 con diversas cantidades del anticuerpo competidor R&D Systems (anticuerpo monoclonal GITR/TNFRSF18). Existe alguna competencia observada en la concentración mayor de anticuerpo, pero esto se debe más probablemente al impedimento estérico.

La Figura 16 muestra el análisis cinético del anticuerpo 6C8 anti-GITR versus el anticuerpo GITR R&D Systems.

La Figura 17 es una gráfica que muestra el porcentaje de supervivencia de ratones inyectados con células B16 tratadas con mitomicina C luego de tratamiento con el anticuerpo anti-GITR (molécula GITR anti-ratón 2F8 de rata).

Las Figuras 18A-18D describen las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de la cadena pesada variable (VHD) (A y B, respectivamente) y la cadena ligera variable (VKA) (C y D, respectivamente) de la molécula de unión 6C8. Las secuencias líderes se muestran en negrilla; las secuencias de estructura principal se subrayan; las secuencias CDR están en cursiva.

Las Figuras 19A y 19B son gráficas que muestran que los fragmentos 2F8 y 2F8 F(ab')<sub>2</sub> mejoran la respuesta humoral a HA.

Las Figuras 20A y 20B son gráficas que muestran que los fragmentos 2F8 y 2F8 F(ab')<sub>2</sub> mejoran la respuesta humoral a Ova.

#### Descripción Detallada de la Invención

La presente invención proporciona moléculas de unión que se unen específicamente a GITR, por ejemplo, el GITR humano (hGITR), en células T y células dendríticas. Las moléculas de unión de la invención se caracterizan mediante unión a hGITR con alta afinidad, y en la presencia de un agente de estimulación, por ejemplo, CD3, estas son agonísticas, y abrogan la supresión de las células efectoras T (Teff) mediante las células reguladoras T (Treg). Diversos aspectos de la invención se relacionan con las moléculas de unión, y las composiciones farmacéuticas de las mismas. Los métodos para utilizar una molécula de unión de la invención para detectar el GITR humano o para modular la actividad GITR humana, ya sea in vitro o in vivo, también se abarcan por la invención.

Con el fin de que la presente invención se pueda entender más fácilmente, primero se definen ciertos términos.

#### I. Definiciones

El término "receptor TNF que induce glucocorticoides" (abreviado aquí como "GITR"), también conocido como superfamilia del receptor TNF 18 (TNFRSF18), como se utiliza aquí, se refiere a un elemento de la familia del receptor del factor de crecimiento de nervio/factor de necrosis tumoral. Es una proteína de transmembrana tipo I de 241 aminoácidos caracterizado por tres pseudorepeticiones de cisteína en el dominio extracelular y específicamente protege la apoptosis inducida por el receptor de célula T, aunque no protege las células de otras señales apoptóticas, que incluyen activar Fas, tratamiento de dexametasona, o irradiación UV (Nocentini, G, et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:6216-622). La secuencia de ácidos nucleicos del GITR humano (hGITR) se establece en la SEQ ID NO: 17 y la secuencia de aminoácidos se establece en la SEQ ID NO: 18.

El término "molécula de unión" como se utiliza aquí incluye moléculas que contienen por lo menos un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a GITR. "Se une específicamente" significa que las moléculas de unión exhiben la unión esencialmente de fondo a moléculas no GITR. Una molécula de unión aislada que se une específicamente GITR, sin embargo, puede tener reactividad cruzada a moléculas GITR de otras especies.

Las moléculas de unión de la invención pueden comprender una cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier isotipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, y IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2) o subclase de la molécula de inmunoglobulina. Las moléculas de unión pueden tener una cadena ligera y pesada. Como se utiliza aquí, el término molécula de unión también incluye, anticuerpos (que incluyen anticuerpos de longitud completa), anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos, y fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos producidos por una colección de expresión Fab, fragmentos de unión a epítomo de cualquiera de los

anteriores, y formas construidas por ingeniería de anticuerpos, por ejemplo, moléculas scFv, siempre y cuando exhiban la actividad deseada, por ejemplo, unión a GTR.

Un "antígeno" es una entidad (por ejemplo, una entidad proteínica o péptido) al que se une específicamente una molécula de unión.

5 El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio en un antígeno al que una molécula de unión se une específicamente. Los epítipos se pueden formar de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante plegado terciario de una proteína. Los epítipos formados de los aminoácidos contiguos se retienen normalmente en exposición a disolventes desnaturizantes mientras que los epítipos formados por plegado terciario se pierden normalmente en tratamiento con disolventes desnaturizantes. Un epítipo incluye normalmente por lo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítipos incluyen, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996).

15 Las moléculas de unión que reconocen el mismo epítipo se pueden identificar en un inmunoensayo simple que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno objetivo, es decir, un ensayo de unión competitivo. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la molécula de unión que se prueba inhibe la unión específica de una molécula de unión de referencia en un antígeno común, tal como GTR. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitivos, por ejemplo: radioinmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA); inmunoensayo de enzima directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competencia intercalado (véase Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA de biotina-avidina de fase sólida directa (véase Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensayo marcado directo de fase sólida, ensayo intercalado marcado directo de fase sólida (véase Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marca directa de fase sólida utilizando la marca I-125 (véase Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA de biotina-avidina de fase sólida directa (Cheung et al., *Virology* 176:646 (1990)); y RIA marcado directo. (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Normalmente, dicho ensayo implica el uso del antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de estos, una molécula de unión de prueba no marcada y una molécula de unión de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide al determinar la cantidad de marca unida a la superficie sólida o células en la presencia de la molécula de unión de prueba. Usualmente la molécula de unión de prueba está presente en exceso. Usualmente, cuando una molécula de unión de competencia está presente en exceso, inhibirá la unión específica de una molécula de unión de referencia a un antígeno común mediante por lo menos 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 % 70-75 % o más.

Un epítipo también se reconoce por células inmunológicas, por ejemplo, células B y/o células T. El reconocimiento celular de un epítipo se puede determinar mediante ensayos in vitro que miden la proliferación dependiente de antígeno, como se determina mediante la incorporación de 3H-timidina, mediante secreción de citoquina, mediante secreción de anticuerpo, o mediante muerte dependiente de antígeno (ensayo de linfocito T citotóxico).

El término "molécula de unión monoclonal" como se utiliza aquí se refiere a una molécula de unión obtenida de una población de moléculas de unión sustancialmente homogéneas. Las moléculas de unión monoclonales son altamente específicas, están dirigidas contra un sitio antigénico único. Adicionalmente, en contraste a las preparaciones de la molécula de unión policlonal que incluyen normalmente diferentes moléculas de unión dirigidas contra diferentes determinantes (epítipos), cada molécula de unión monoclonal está dirigida contra un determinante único en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter de la molécula de unión que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de moléculas de unión, y no se constituye como que requiere la producción de la molécula de unión mediante cualquier método particular. Por ejemplo, las moléculas de unión monoclonales que se utilizan de acuerdo con la presente invención se pueden hacer mediante el método de hibridoma primero descrito por Kohler, et al., *Nature* 256:495 (1975), o se pueden hacer mediante métodos de ADN recombinantes (véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,816,567). Las "moléculas de unión monoclonales" también se pueden aislar de colecciones de anticuerpo de fago utilizando las técnicas descritas en, por ejemplo Clackson, et al., *Nature* 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol Biol.* 222:581-597 (1991).

El término "molécula de unión quimérica" se refiere a una molécula de unión que comprende las secuencias de aminoácidos derivadas de diferentes especies. Las moléculas de unión quiméricas se pueden construir, por ejemplo mediante ingeniería genética, de segmentos de gen de la molécula de unión que pertenece a diferentes especies.

Las moléculas de unión monoclonales aquí incluyen específicamente las moléculas de unión "quiméricas" en las que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con o homóloga a las secuencias correspondientes en las moléculas de unión derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, aunque el resto de las cadenas es idéntico a o homólogo a las secuencias correspondientes en las

moléculas de unión derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como también fragmentos de dichas moléculas de unión, mientras que exhiben la actividad biológica deseada (Patente Estadounidense No. 4,816,567; y Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)). Por ejemplo, unión al G1TR humano (hG1TR).

5 Las cadenas ligera y pesada se dividen en regiones de homología estructural y funcional. Los términos "constante" y "variable" se utilizan funcionalmente. A este respecto, se apreciará que los dominios variables de las porciones de cadena ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento de antígeno y especificidad. Por el contrario, los dominios constantes de la cadena ligera (CL) y la cadena pesada (CH1, CH2 o CH3) confieren propiedades biológicas importantes tal como secreción, movilidad transplacentaria, unión al receptor Fc \*, unión de complemento, y similares. Por convención la numeración de los dominios de región constante aumenta cuando se vuelven más distales desde el sitio de unión a antígeno o terminal amino del anticuerpo. El terminal N es una región variable y en el terminal C es una región constante; los dominios CH3 y CL comprenden actualmente el terminal carboxi de la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente.

15 Una "región variable" cuando se utiliza en referencia a una molécula de unión se refiere a la porción de terminal amino de una molécula de unión que confiere unión a antígeno en la molécula y que no es la región constante. El término incluye fragmentos funcionales de la misma que mantienen algunas o todas las funciones de unión de la región variable completa.

20 El término "región hipervariable" cuando se utiliza aquí se refiere a las regiones de un dominio de molécula de unión variable que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. La región hipervariable comprende los residuos de aminoácido de una "región determinante de complementariedad" o "CDR".

25 Como se utiliza aquí, el término "CDR" o "región determinante de complementariedad" significa los sitios de combinación de antígeno no contiguos encontrados dentro de la región variable de los polipéptidos de cadena pesada y ligera. Estas regiones particulares se han descrito por Kabat, et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) y Kabat, et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), y por Chothia, et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) y por MacCallum, et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) en donde las definiciones incluyen superposición o subconjuntos de los residuos de aminoácido cuando se comparan entre sí. No obstante, la aplicación de la definición para referirse a un CDR de una molécula de unión o molécula de unión injertada o variantes de la misma está dentro del alcance del término como se define y se utiliza aquí.

30 Como se utiliza aquí, el término "región de estructura" o "FR" significa cada dominio de la estructura que se separa por los CDR. Por lo tanto, una estructura principal de región variable está entre aproximadamente 100-120 aminoácidos de longitud pero se refiere a solo aquellos aminoácidos fuera de los CDR.

35 Las formas "humanizadas" de las moléculas de unión no humanas (por ejemplo, murino) son anticuerpos quiméricos que contienen la secuencia mínima de los derivados de la molécula de unión no humana. Para la mayor parte, las moléculas de unión humanizadas son moléculas de unión humanas (molécula de unión receptora/aceptora) en la que los residuos de una región hiper-variable se reemplaza por residuos de una región hipervariable de una especie diferente a humana (molécula de unión donante) tal como ratón, rata, conejo o primate diferente a humano que tiene especificidad, afinidad, y capacidad específica. En algunos casos, los residuos de la región de estructura Fv (FR) de la molécula de unión humana se alteran, por ejemplo, se reemplazan por, sustituyen, o retromutan a residuos no humanos correspondientes. Adicionalmente, como moléculas de unión humanizadas pueden comprender residuos que no se encuentran en la molécula de unión receptora o en la molécula de unión donante. Estas modificaciones se hacen de manera general para refinar adicionalmente el desempeño de la molécula de unión. En general, la molécula de unión humanizada comprenderá sustancialmente todo de por lo menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables que corresponden a aquellos de una molécula de unión no humana y todos o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de moléculas de unión humanas. La molécula de unión humanizada también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante de la molécula de unión (Fc), normalmente de una molécula de unión humana. Para detalles adicionales, véase Jones, et al., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann, et al., Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

50 Se caracterizan aquí las siguientes secuencias de CDR: SEQ ID NO: 3 (GFSLSTSGMGV (HC CDR1)), SEQ ID NO: 4 (HIWWDDDKYYNPSLKS (HC CDR2N)), SEQ ID NO: 5 (TRRYFPFAY (HC CDR3)), SEQ ID NO: 6 (KASQNVGTNVA (LC CDR1)), SEQ ID NO: 7 (SASYRYS (LC CDR2)), SEQ ID NO: 8 (QQYNTDPLT (LC CDR3)), y SEQ ID NO: 19 (HIWWDDDKYYQPSLKS (HC CDR2Q)).

El término molécula de unión "construida por ingeniería" o "recombinante", como se utiliza aquí incluye las moléculas de unión que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tal como las moléculas de unión

expresadas utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula anfitriona, las moléculas de unión aisladas de una colección de molécula de unión recombinante, combinatoria, las moléculas de unión aisladas de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase por ejemplo, Taylor, L.D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o las moléculas de unión preparadas, expresadas, creadas o aisladas mediante cualesquier otros medios que implican la división de las secuencias de gen de la molécula de unión humana con otras secuencias de ADN. Sin embargo, en ciertas realizaciones, dichas moléculas de unión humanas recombinantes se someten a mutagenia in vitro (o, cuando se utiliza un animal transgénico para las secuencias humanas Ig, mutagenia somática in vivo) y así las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de las moléculas de unión recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de y se relacionan con secuencias VH y VL de línea germinal humana, no pueden existir en forma natural dentro del repertorio de línea germinal de la molécula de unión humana in vivo.

Una "molécula de unión aislada", como se utiliza aquí, se refiere a una molécula de unión que es sustancialmente libre de otras moléculas de unión que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, una molécula de unión aisladas que se une específicamente a GITR está sustancialmente libre de las moléculas de unión que unen específicamente los antígenos diferente de GITR). Más aún, una molécula de unión aislada puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o químicos. Una molécula de unión "aislada" es una que se ha identificado y separado y/o se recupera de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural incluyen, por ejemplo, materiales que no interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para la molécula de unión, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, la molécula de unión se purificará (1) a más de 95 % en peso de la molécula de unión según se determina por el método Lowry, y más preferiblemente más de 99 % en peso, (2) un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de terminal N o la secuencia de aminoácidos interna mediante el uso de un secuenciador de copa de centrifugación, o (3) para homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones de reducción o no reducción utilizando azul Coomassie o, preferiblemente, tinción plata. Las moléculas de unión aisladas incluyen las moléculas de unión in situ dentro de las células recombinantes debido a por lo menos no estará presente un componente del ambiente natural de la molécula de unión. De forma ordinaria, sin embargo, las moléculas de unión aisladas se prepararán mediante por lo menos una etapa de purificación.

Como se utiliza aquí el término "constante de unión" "(kd)", también se denomina como "constante de afinidad", es una medida del grado de una asociación reversible entre dos especies moleculares incluye la afinidad de unión actual así como también la afinidad de unión evidente. La afinidad de unión actual se determina al calcular la relación de  $K_{soc}$  en  $M^{-1}S^{-1}$  a  $K_{disoc}$  en  $S^{-1}$  y tiene las unidades " $M^{-1}$ ". Por lo tanto, confiere o optimiza la afinidad de unión incluye alterar uno o ambos de estos componentes para lograr el nivel deseado de afinidad de unión. La afinidad evidente puede incluir, por ejemplo, la avidez de la interacción. Por ejemplo, un fragmento de unión de región variable heteromérica bivalente puede exhibir la afinidad de unión alterada u optimizada debido a su valencia. Se puede determinar la afinidad de unión se puede determinar mediante medición de resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo, utilizando el sistema BIAcore.

El término "molécula de ácido nucleico", como se utiliza aquí, incluye moléculas de ADN y moléculas ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser ADN de hebra sencilla o de hebra doble, pero preferiblemente es de hebra doble.

El término "molécula de ácido nucleico aislada", como se utiliza aquí con referencia a los ácidos nucleicos que codifican las moléculas de unión que unen a GITR, se refiere a una molécula de ácido nucleico en la que la secuencia de nucleótidos que codifica la molécula de unión están libres de otras secuencias de nucleótidos que otras secuencias pueden flanquear naturalmente el ácido nucleico en ADN genómico humano. Estas secuencias pueden incluir opcionalmente 5' o 3' secuencias de nucleótido importante para regulación o estabilidad de proteína.

El término "vector", como se utiliza aquí, se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico a la que se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN de hebra doble circular en el que se pueden ligar de segmentos ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde se pueden ligar de ADN adicionales en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación automática en una célula anfitriona en los que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómico). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se pueden integrar dentro del genoma de una célula anfitriona luego de la introducción dentro de la célula anfitriona, y por lo tanto se replican junto con el genoma anfitrión. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se ligan operativamente. Dichos vectores se denominan aquí como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinantes frecuentemente están en la forma de plásmidos. En la presente especificación, "plásmido" y "vector" se puede utilizar intercambiamente cuando el plásmido es la forma más comúnmente utilizada del vector. Sin embargo, la invención incluye dichas otras formas de vectores de expresión, tal como

vectores víricos (por ejemplo, retrovirus defectuoso de replicación, adenovirus y virus adeno asociado), que sirven para funciones equivalentes.

El término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula anfitriona"), como se utiliza aquí, se refiere a una célula en el que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Cabe entender que dichos términos pretenden referirse no solo con la célula del sujeto particular sino con la progenie de dicha célula. Debido a que pueden ocurrir ciertas modificaciones en generaciones futuras debido a sus influencias de mutación o ambientales, dicha progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula progenitora, pero aún se incluyen dentro del alcance del término "célula anfitriona" como se utiliza aquí.

Como se utiliza aquí, el término "célula T" (es decir, linfocito T) incluye todas las células dentro del linaje celular T, que incluye timocitos, células T inmaduras, células T maduras y similares, de un mamífero (por ejemplo, humano). Preferiblemente, las células T son células T maduras que expresan CD4 o CD8, pero no ambos, y un receptor de célula T. Las diversas poblaciones de células T descritas aquí se pueden definir con base en sus perfiles de citoquina y su función, y se conocen por un experto en la técnica.

Como se utiliza aquí, el término "célula dendrítica" se refiere células profesionales que presentan antígenos (APC) capaces de activar las células T vírgenes y estimular el crecimiento y diferenciación de células B.

Como se utiliza aquí, el término "células T vírgenes" incluye células T que no se han expuesto al antígeno cognato y así no se activan o las células de memoria. Las células T vírgenes no se ciclizan y las células T vírgenes humanas son CD45RA+. Si las células T vírgenes reconocen el antígeno y reciben señales adicionales dependiendo de pero no limitado a la cantidad de antígeno, la ruta de administración y el tiempo de administración, estas pueden proliferar y diferenciar en diversos subconjuntos de células T, por ejemplo células T efectoras.

Como se utiliza aquí, el término "célula T efectora" o "célula T<sub>eff</sub>" incluye células T que funcionan para eliminar el antígeno (por ejemplo, al producir citoquinas que modulan la activación de otras células o mediante actividad citotóxica). El término "célula T efectora" incluye células auxiliares T (por ejemplo, células Th1 y Th2) y células T citotóxicas. Las células Th1 median las respuestas de hipersensibilidad tipo retrasado y la activación de macrófagos mientras que las células Th2 proporcionan ayuda a las células B y son críticas en la respuesta alérgica (Mosmann and Coffman, 1989, Annu. Rev. Immunol. 7, 145-173; Paul y Seder, 1994, Cell 76, 241-251; Arthur and Mason, 1986, J. Exp. Med. 163, 774-786; Paliard, et al., 1988, J. Immunol. 141, 849-855; Finkelman, et al., 1988, J. Immunol. 141, 2335-2341).

Como se utiliza aquí, el término "respuesta tipo 1 de célula auxiliar" (respuesta Th1) se refiere a una respuesta que se caracteriza por la producción de una o más citoquinas seleccionadas de IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF, y limfotóxina (LT) y otras citoquinas producidas preferiblemente o exclusivamente por células Th1 a diferencia de células Th2. Como se utiliza aquí, una "respuesta tipo 2 de auxiliar T" (respuesta Th2) se refiere a una respuesta por células T CD4+ que se caracteriza por la producción de una o más citoquinas seleccionadas de IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10, y que se asocia con célula B eficiente "auxiliar" proporcionada por las células Th2 (por ejemplo, producción mejorada de IgG1 y/o IgE).

Como se utiliza aquí, el término "célula T reguladora" o "célula T<sub>reg</sub>" incluye células T que producen bajos niveles de IL-2, IL-4, IL-5, y IL-12. Las células T reguladoras producen TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IFN- $\gamma$ , y IL-10, aunque a niveles menores que las células T efectoras. Aunque el TGF $\beta$  es la citoquina predominante producida por células T reguladoras, la citoquina se produce a niveles menores que o iguales a aquellos producidos por células Th1 o Th2, por ejemplo, un orden de magnitud menor en células Th1 o Th2. Se pueden encontrar células T reguladoras en la población de células CD4+CD25+ (véase, por ejemplo, Waldmann and Cobbold. 2001. Immunity. 14:399). Las células T reguladoras suprimen activamente la proliferación y producción de citoquina de Th1, Th2, o células T vírgenes que se han estimado en el cultivo con una señal activante (por ejemplo, antígeno y células que presentan antígeno o con una señal que imita el antígeno en el contexto de MHC, por ejemplo, anticuerpo anti-CD3, más el anticuerpo anti-CD28).

Como se utiliza aquí, el término "tolerancia" incluye refractividad para activar el estímulo mediado por el receptor. Dicha refractividad es de manera general específica de antígeno y persiste después que ha cesado la exposición al antígeno tolerante. Por ejemplo, la tolerancia se caracteriza por la falta de producción de citoquina, por ejemplo, IL-2, o se puede evaluar mediante el uso de un ensayo de cultivo de linfocito mezclado. La tolerancia puede ocurrir en auto antígenos o en antígenos externos.

Un "cultivo de linfocito mezclado" ("MLC") es un tipo de prueba de proliferación de linfocito en la que se cultivan los linfocitos de dos individuos y la respuesta proliferativa ("reacción mezclada de linfocito") se mide por absorción de timidina marcada <sup>3</sup>H.

5 Como se utiliza aquí, el término "apoptosis" que también se denomina como muerte celular programada (PCD), es la muerte de una célula caracterizado por que incluye, pero no se limita a, condensación de heterocromatina nuclear, contracción celular, condensación citoplásmica, y en una última etapa de apoptosis, división mediada por endonucleasa del ADN de la célula en fragmentos discretos. Luego del análisis electroforético del ADN de una célula en la que ha ocurrido apoptosis, puede ser evidente una característica de "escalera" de fragmentos de ADN discreto.

10 "Tratamiento" se refiere un tratamiento terapéutico y profiláctico o medidas preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento pueden incluir aquellos que ya tienen un trastorno así como también aquellos que aún no tienen un trastorno.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría de tratamiento con una molécula de unión de la presente invención. Este incluye trastornos o enfermedades agudas y crónicas o afecciones patológicas asociadas con respuestas inmunitarias que son muy altas o muy bajas.

15 Diversos aspectos de la invención se describen en detalle adicional en las siguientes subsecciones.

## II. Moléculas de unión GITR

La presente invención proporciona moléculas de unión GITR aisladas. Las moléculas de unión de ejemplo de la presente invención incluyen el anticuerpo 6C8 y el anticuerpo 2F8. El anticuerpo 6C8 es un anticuerpo anti-GITR que se une a GITR en células T y células dendríticas, por ejemplo, células T humanas y células dendríticas, con alta afinidad. Preferiblemente, dichas moléculas de unión abrogan la supresión de células Teff por células Treg y son agonistas para activar parcialmente las células T in vitro en la presencia de un agente de estimulación, por ejemplo, CD3.

25 En una realización, el dominio VH de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 1. (dominio VH 6C8 "N", que incluye el líder). Se entenderá que aunque algunas de las secuencias de las moléculas de unión descritas aquí incluyen secuencias líder, una molécula de unión de la invención también puede excluir la secuencia líder, que es opcional. Por ejemplo, en una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos de la proteína madura mostrada en la SEQ ID NO: 1. por ejemplo, aminoácidos 20-138 de la SEQ ID NO: 1.

30 En una realización, el dominio VH de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 66. (dominio VH 6C8 "Q", que incluyen el líder).

En una realización, el dominio VL de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 2. (dominio VL 6C8, que incluye el líder).

En una realización, el dominio VH de una molécula de unión de la invención comprende los residuos de aminoácido 20-138 de la SEQ ID NO: 1. (dominio VH 6C8 "N", sin el líder).

35 En una realización, el dominio VH de una molécula de unión de la invención comprende los residuos de aminoácido 20-138 de la SEQ ID NO: 66. (dominio VH 6C8 "Q", sin el líder).

En una realización, el dominio VL de una molécula de unión de la invención comprende los residuos de aminoácido 21-127 de la SEQ ID NO: 2. (dominio VL 6C8, sin el líder).

40 En una realización de la invención la cadena VL comprende una secuencia líder y/o de señal, es decir, los residuos de aminoácido 1-20 de la SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 59). En una realización, la cadena VH comprende una secuencia líder y/o de señal, es decir, los residuos de aminoácido 1-19 de la SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 64).

Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VH que comprende un CDR establecido en la SEQ ID NO: 3. (6C8 VH CDR1).

45 Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VH que comprende un CDR establecido en la SEQ ID NO: 4. (6C8 VH CDR2-"N").

Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VH que comprende un CDR establecido en la SEQ ID NO: 5. (6C8 VH CDR3).

Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VH que comprende un CDR establecido en la SEQ ID NO: 19. (6C8 VH CDR2 alterna "Q").

5 Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VL que comprende un CDR establecido en la SEQ ID NO: 6. (6C8 VL CDR1).

Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VL que comprende un CDR establecido en la SEQ ID NO: 7. (6C8 VL CDR2).

10 Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VL que comprende un CDR establecido en la SEQ ID NO: 8. (6C8 VL CDR3).

Un dominio VH de una molécula de unión de la invención caracteriza la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 9. (dominio VH 6C8, "N", que incluye el líder).

Un dominio VH de una molécula de unión de la invención caracteriza la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 65. (dominio VH 6C8, "Q", que incluye el líder).

15 Un dominio VH de una molécula de unión de la invención caracteriza los nucleótidos 58-414 de la SEQ ID NO: 9. (dominio VH 6C8, "N", sin el líder).

Un dominio VH de una molécula de unión de la invención caracteriza los nucleótidos 58-414 de la SEQ ID NO: 65. (dominio VH 6C8, "Q", sin el líder).

20 Un dominio VL de una molécula de unión de la invención caracteriza la secuencia de nucleótidos establecida en la SEQ ID NO: 10. (dominio VL 6C8, que incluye el líder).

Un dominio VL de una molécula de unión de la invención comprende nucleótidos 61-381 de la SEQ ID NO: 10. (dominio VL 6C8, sin el líder).

Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VH que comprende una secuencia de ácidos nucleicos CDR la cual se establece en la SEQ ID NO: 11. (6C8 VH CDR1).

25 Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VH que comprende una secuencia de ácidos nucleicos CDR la cual se establece en la SEQ ID NO: 12. (6C8 VH CDR2-"AAT").

Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VH que comprende una secuencia de ácidos nucleicos CDR la cual se establece en la SEQ ID NO: 13. (6C8 VH CDR3).

30 Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VH que comprende una secuencia de ácidos nucleicos CDR la cual se establece en la SEQ ID NO: 65. (6C8 VH CDR2 alternado "CAA").

Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VL que comprende una secuencia de ácidos nucleicos CDR la cual se establece en la SEQ ID NO: 14. (6C8 VL CDR1).

35 Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VL que comprende una secuencia de ácidos nucleicos CDR la cual se establece en la SEQ ID NO: 15. (6C8 VL CDR2). Una molécula de unión de la invención caracteriza un dominio VL que comprende una secuencia de ácidos nucleicos CDR la cual se establece en la SEQ ID NO: 16. (6C8 VL CDR3).

En una realización, un dominio CL de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 20. (Región constante de cadena ligera IgG2a de murino).

40 En una realización, un dominio CH de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 21. (Región constante de cadena pesada IgG2a de murino).

## ES 2 432 091 T3

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 22. (6C8 quimérico VL/CL IgG1 humano).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 23. (Gly-6C8 VH quimérico / CH IgG1 humano).

- 5 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 24. (Agly-6C8 VH quimérico / CH IgG1 humano).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 44. (6C8 VL humanizado).

- 10 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 53. (6C8 VH "N" humanizado).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 54. (6C8 VH "Q" humanizado).

En una realización, un dominio CL de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 55. (Región constante de cadena pesada Gly IgG1 humana).

- 15 En una realización, un dominio CH de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 56. (Región constante de cadena pesada Agly IgG1 humana).

En una realización, un dominio CL de una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 57. (Región constante de cadena ligera IgG1 humana).

- 20 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 58. (6C8 Humanizado Completo Ligero).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 60. (6C8 HuN6C8-Gly Completo Humanizado Pesado).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 61. (6C8 HuN6C8-Agly Completo Humanizado Pesado).

- 25 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 62. (6C8 HuQ6C8-Gly Completo Humanizado Pesado).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 63. (6C8 HuQ6C8-Agly Completo Humanizado Pesado).

- 30 En una realización, una molécula de unión de la invención tiene las secuencias VL y VH como se muestra en las Figuras 18A-18D; la secuencia de aminoácidos de la región 6C8 VH también se muestra en la SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de la región 6C8 VL se muestra en la SEQ ID NO: 2. En otra realización, una molécula de unión de la invención tiene las secuencias LC y HC como se establece en la SEQ ID NOs: 20 y 21;

ADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKIDINVKWKIDGSRQNGVLNS  
WTDQDSKDYMSSTLTCLKDEYERHNSYTCEATHKTSSTPIVKSFNRE (SEQ  
ID NO:20);

AKTTPSVYPLAPGCGDITGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSVHTFPA  
LLQSGLYTMSSSVTPVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTVDDKLEPSGPISITINPCPP  
CKECKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVTCTVVVDVSEDDPDVQISWF  
VNNVEVHTAQTQTHREDYNSITRVVSTLPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPSPI  
ERTISKIKGLVRAQVYILPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTE  
ENYKDTAPVLDSGYSFYISKLNMKTSKWEKTDSEFCNVRHEGLKNYLLKKTIS  
RSPGK (SEQ ID NO:21).

5 En una realización de la invención la cadena VL comprende una secuencia líder y/o de señal, por ejemplo, los residuos de aminoácido 1-20 de la SEQ ID NO: 2. En una realización, la cadena VH comprende una secuencia líder y/o de señal, por ejemplo, los residuos de aminoácido 1-19 de la SEQ ID NO: 1. En otra realización, una molécula de unión de la invención no comprende una secuencia líder y/o de señal.

10 La invención pertenece a las moléculas de unión 6C8y otras moléculas de unión con propiedades equivalentes 6C8, tal como unión de alta afinidad a GITR y abrogación de la supresión de células Teff mediante células Treg. Adicionalmente, las moléculas de unión de la invención no inducen apoptosis, ni exhiben una reacción de linfocito mezclada. De acuerdo con lo anterior, las moléculas de unión equivalentes de la invención son agonistas GITR, es decir, inducen la señalización por medio de GITR. GITR es un elemento de la superfamilia TNFR. Debido a que los miembros de la familia TNFR están implicados en la supervivencia celular y apoptosis mediante señalización a través de NF- $\kappa$ B, en una realización, las moléculas de unión de la presente invención atenúan la degradación de I- $\kappa$ B.

15 En una realización, la invención proporciona las moléculas de unión hGITR aisladas con una región variable de cadena ligera (VL) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y opcionalmente una secuencia líder, y una región variable de cadena pesada (VH) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y opcionalmente una secuencia líder. En ciertas realizaciones, una molécula de unión comprende una región constante de cadena pesada, tal como una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD.  
20 Adicionalmente, la molécula de unión puede comprender una región constante de cadena ligera, una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. Preferiblemente, la molécula de unión comprende una región constante de cadena ligera kappa. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de cadena ligera como se establece en la SEQ ID NO: 20. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 21. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 55. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 56. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de cadena pesada como se establece en la SEQ ID NO: 57.

30 La invención proporciona una molécula de unión que tiene dominios CDR VL relacionados con 6C8, por ejemplo, las moléculas de unión con una región variable de cadena ligera (VL) que tiene dominios CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos que consisten de la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8.

La invención proporciona una molécula de unión que tiene los dominios CDR VH relacionados con 6C8, por ejemplo, las moléculas de unión con una región variable de cadena ligera (VH) que tienen los dominios CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos que consisten de la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, y SEQ ID NO: 19.

35 En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende por lo menos un CDR derivado de una molécula de unión anti-humana GITR de murino, por ejemplo, una molécula de unión 6C8. Como se utiliza aquí el término "derivado de" una proteína designada se refiere al origen del polipéptido. En una realización, la secuencia de polipéptidos o aminoácidos que se deriva de un polipéptido de inicio particular es una secuencia CDR o secuencia relacionada de los mismos. En otra realización, la secuencia de polipéptidos o aminoácidos que se deriva de un polipéptido de partida particular es una secuencia FR o secuencia relacionada con este. En una realización, la  
40 secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de partida particular no es contigua.

5 Por ejemplo, en una realización, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis CDR se derivan de un anticuerpo de murino 6C8. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende por lo menos un CDR de cadena pesada o ligera de un anticuerpo 6C8 de murino. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende por lo menos dos CDR de un anticuerpo 6C8 de murino. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende por lo menos tres CDR de un anticuerpo 6C8 de murino. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende por lo menos cuatro CDR de un anticuerpo 6C8 de murino. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende por lo menos cinco CDR de un anticuerpo 6C8 de murino. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende por lo menos seis CDR de un anticuerpo 6C8 de murino.

10 También se entenderá por una persona medianamente versada en la técnica que una molécula de unión de la invención se puede modificar de tal manera que varían en la secuencia de aminoácidos de la molécula 6C8 de la que se derivan. Por ejemplo, las sustituciones de nucleótidos o aminoácidos conducen a sustituciones conservadoras o cambios en los residuos de aminoácido "no esenciales" se pueden hacer (por ejemplo, en CDR y/o residuos de estructura) y mantener la capacidad de unirse a GITR, por ejemplo, el GITR humano.

15 En una realización, por lo menos un CDR (o por lo menos un CDR de más de uno de los CDR 6C8 que están presentes en la molécula de unión) se modifica para variar en la secuencia del CDR de una molécula de unión 6C8 que ocurre en forma natural, todavía retiene la capacidad de unirse a 6C8. Por ejemplo, en una realización, uno o más CDR de un anticuerpo 6C8 se modifican para retirar los sitios de glucosilación potencial. Por ejemplo, debido a que la secuencia de aminoácidos Asn-X- (Ser/Thr) es una secuencia consensus putativa para un sitio de glucosilación que puede afectar la producción de la molécula de unión, y CDR2 de la cadena pesada 6C8 tiene la secuencia Asn- Pro-Ser, una segunda versión de la cadena pesada se prepara para sustituir conservadoramente una glutamina (Gln) por una asparagina (Asn) en el residuo de aminoácido 62 de la SEQ ID NO: 53.

20 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una secuencia de polipéptidos o aminoácidos que es esencialmente idéntica a aquella de un anticuerpo 6C8, o una porción del mismo en donde la porción consiste de por lo menos 3-5 aminoácidos, de por lo menos 5-10 aminoácidos, por lo menos 10-20 aminoácidos, por lo menos 20-30 aminoácidos, o por lo menos 30-50 aminoácidos, o que es de otra forma identificable para un experto en la técnica que tiene su origen en la secuencia de partida.

25 En otra realización, la secuencia de polipéptidos o aminoácidos que se derivada de de una secuencia de polipéptidos o aminoácidos de partida particular comparte una identidad de secuencia de aminoácido que es aproximadamente 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o que es de otra forma identificable para un experto en la técnica que tiene su origen en la secuencia de partida.

30 Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una variante no natural de un polipéptido se puede crear al introducir una o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de nucleótido en la secuencia de nucleótidos de la molécula de unión de tal manera que uno o más sustituciones, adiciones o eliminaciones de aminoácido se introducen en la proteína codificada. Las mutaciones se pueden introducir mediante técnicas estándar, tal como mutagenia dirigida a sitio y mutagenia mediada por PCR. En una realización, se hacen sustituciones de aminoácido conservadoras en uno o más residuos de aminoácido no esenciales. Una "sustitución de aminoácido conservador" es uno en el que el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de los residuos de aminoácido tienen cadenas laterales similares que se han identificado en la técnica, que incluyen cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), las cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofán), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofán, histidina). Sin embargo, un residuo de aminoácido no esencial en una molécula de unión polipéptido se puede reemplazar con otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadena lateral. En otra realización, una cadena de aminoácidos se puede reemplazar con una cadena estructuralmente similar que difiere en orden y/o la composición de los miembros de la familia de cadena lateral.

35 Alternativamente, en otra realización, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de todo o parte de la secuencia que codifica la molécula de unión.

40 Las moléculas de unión preferidas de la invención comprenden las secuencias de aminoácidos de estructura y de región constante derivadas de una secuencia de aminoácidos humana. Sin embargo, las moléculas de unión pueden comprender secuencias de región constante y/o de estructura derivadas de otras especies de mamífero. Por ejemplo, se pueden incluir una región de estructura de primate (por ejemplo, primate diferente a humano), la porción de cadena pesada, y/o la porción articulada en las moléculas de unión del sujeto. En una realización, uno o más aminoácidos de murino pueden estar presentes en la región de estructura de un polipéptido de unión, por ejemplo,

una secuencia de aminoácidos de estructura de humano o primate diferente a humano puede comprender una o más sustituciones y/o retromutaciones de aminoácido en las que está presente el residuo de aminoácidos de murino correspondiente. Las moléculas de unión preferidas de la invención son menos inmunogénicas que el anticuerpo de murino 6C8 de partida.

5 La presente invención también caracteriza las moléculas de unión quiméricas y/o humanizadas (es decir, inmunoglobulinas quiméricas y/o humanizadas) específicas para GITR. Las moléculas de unión quiméricas y/o humanizadas tienen la misma o especificidad de unión similar y afinidad como las moléculas de unión de ratón o no humanas que proporcionan la construcción del material de partida de una molécula de unión quimérica o humanizada.

10 Una molécula de unión quimérica es una cuyos genes de cadena pesada y ligera se han construido, normalmente mediante ingeniería genética, de segmentos de gen de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de una molécula de unión monoclonal de ratón se une a los segmentos humanos constantes (C), tal como IgG1 o IgG4. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. Una molécula de unión quimérica de ejemplo es así una proteína híbrida que consiste del dominio de unión a antígeno o V de una  
15 molécula de unión de ratón y el dominio C o efector de molécula de unión humana.

En una realización, la invención pertenece las regiones variables humanizadas de la molécula de unión 6C8 y los polipéptidos que comprenden dichas regiones variables humanizadas. En una realización, una molécula de unión de la invención comprende por lo menos una región variable de molécula de unión 6C8 humanizada, por ejemplo, una región variable de cadena ligera o cadena pesada.

20 El término "molécula de unión humanizada" se refiere a una molécula de unión que comprende por lo menos una cadena que comprende los residuos de estructura principal de región variable derivados de una cadena humana de molécula de unión (denominado como la inmunoglobulina receptora o molécula de unión) y por lo menos una región determinante de complementariedad derivada de una molécula de unión de ratón, (denominado como la inmunoglobulina donante o molécula de unión). Las moléculas de unión humanizadas se pueden producir utilizando  
25 tecnología de ADN recombinante, que se discute adelante. Véase por ejemplo, por ejemplo, Hwang, W.Y.K., et al. (2005) *Methods* 36:35; Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1989), 86:10029-10033; Jones et al., *Nature*, (1986), 321: 522-25; Riechmann et al., *Nature*, (1988), 332:323-27; Verhoeyen et al., *Science*, (1988), 239:1534-36; Orlandi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1989), 86:3833-37; Patente Estadounidense Nos. US 5,225,539; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 6,180,370, Selick et al., WO 90/07861, y Winter, US 5,225,539. Las  
30 regiones constantes, si están presentes, preferiblemente también se derivan de una inmunoglobulina humana.

Cuando una molécula de unión donante no humana preferida se ha seleccionado para humanización, se puede obtener una molécula de unión receptora humana apropiada, por ejemplo, de las bases de datos de secuencia de los genes de anticuerpo humano expresadas, de las secuencias Ig de línea germinal o una secuencia consenso de diversas moléculas de unión humanas.

35 En una realización, se utiliza un método con base en homología CDR para humanización (véase, por ejemplo, Hwang, W.Y.K., et al. (2005) *Methods* 36:35. Este método implica de manera general la sustitución de CDR de ratón en una estructura principal de dominio variable humano con base en CDR de ratón y humanas similarmente estructurados a diferencia de estructuras de ratón y humanas similarmente estructuradas. La similitud de los CDR de ratón y humano se determina de manera general al identificar los genes humanos del mismo tipo de cadena (ligera o  
40 pesada) que tienen la misma combinación de estructuras CDR canónicas como las moléculas de unión de ratón y así retienen la conformación tridimensional de las estructuras de péptido CDR. En segundo lugar, para cada uno de los genes variables candidatos con estructuras canónicas emparejadas, la homología residuo a residuo entre los CDR humanos de ratón y candidato se evalúa. Finalmente, para generar una molécula de unión humanizada, los residuos CDR del CDR candidato humano seleccionado ya no es idéntico al CDR de ratón se convierten a la  
45 secuencia de ratón. En una realización, no se introducen mutaciones de la estructura principal humana en la molécula de unión humanizada.

En una realización, las secuencias de línea germinal humanas se evalúan para homología CDR a los CDR de molécula de unión GITR. Por ejemplo, para el anticuerpo de murino 6C8, todos los genes V de cadena kapa ligera de línea germinal con una estructura canónica 2-1-1 en la base de datos IMGT se comparan con la secuencia de anticuerpos 6C8. Lo mismo se hace para la cadena pesada en donde todos los genes V de cadena pesada de línea  
50 germinal 3-1 se comparan con la secuencia de aminoácidos 6C8. De acuerdo con lo anterior, en una realización, una molécula de unión de la invención comprende una estructura de región V de cadena kapa humana con una estructura canónica 2-1-1. En otra realización, una molécula de unión de la invención comprende una estructura de región V de cadena pesada humana con una estructura canónica 3-1.

Se identifican las siguientes secuencias de línea germinal de cadena ligera humana potencial y se pueden incorporar en una molécula de unión de la invención:

El número de acceso IMGT del gen IGKV3-15 es M23090. La secuencia de aminoácidos es:

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTR  
ATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNWP (SEQ ID NO:25).

5 El número de acceso IMGT del gen IGKV3D-11 es X17264. La secuencia de aminoácidos es:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA  
TGIPARFSGSGPGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWH (SEQ ID NO:26).

Existen dos alelos del gen IGKV3-11. El número de acceso IMGT del alelo \*01 del gen IGKV3-11 es X01668. La secuencia de aminoácidos es:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA  
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWP (SEQ ID NO:27).

10 El número de acceso IMGT del alelo \*02 del gen IGKV3-11 es K02768. La secuencia de aminoácidos es:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA  
TGIPARFSGSGSGRDFTLTISLLEPEDFAVYYCQQRSNWP (SEQ ID NO:28).

El número de acceso IMGT del gen IGKV1D-43 es X72817. La secuencia de aminoácidos es:

AIRMTQSPFSLASVGDRVTITCQASQGISSYLAWYQQKPAKAPKLFIIYASSLQ  
SGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQYYSTP (SEQ ID NO:29).

15 Existen dos alelos del gen IGKV1-39. El número de acceso IMGT del alelo \*01 del gen IGKV1-39 es X59315. La secuencia de aminoácidos es:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ  
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTP (SEQ ID NO:30).

El número de acceso IMGT del alelo \*02 del gen IGKV1-39 es X59318. La secuencia de aminoácidos es:

DIQMTQSPSFLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ  
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQCGYSTP (SEQ ID NO:31).

El número de acceso IMGT del gen IGKV1-33 es M64856. La secuencia de aminoácidos es:

20 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLE  
TGVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDVATYYCQYDNLFP (SEQ ID NO:32).

El número de acceso IMGT del gen IGKV1-27 es X63398. La secuencia de aminoácidos es:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASSTLQ  
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQKYNSAP (SEQ ID NO:33).

Existen dos alelos del gen IGKV1-17. El número de acceso IMGT del alelo \*01 del gen IGKV1-17 es X72808. La secuencia de aminoácidos es:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSL  
QSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNSYP (SEQ ID NO:34).**

El número de acceso IMGT del alelo \*02 del gen IGKV1-17 es D88255. La secuencia de aminoácidos es:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSL  
QSGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISNLQPEDFATYYCLQHNSYP (SEQ ID NO:35).**

Existen dos alelos del gen IGKV1D-16. El número de acceso IMGT del alelo \*01 del gen IGKV1D-16 es K01323. La secuencia de aminoácidos es:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQ  
SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYNSYP (SEQ ID NO:36).**

El número de acceso IMGT del alelo \*02 del gen IGKV1D-16 es J00244. La secuencia de aminoácidos es:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRARQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQ  
SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYNSYP (SEQ ID NO:37).**

El número de acceso IMGT del gen IGKV1-16 es J00248. La secuencia de aminoácidos es:

**DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQGISNYLAWFQQKPGKAPKSLIYAASSLQ  
SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYNSYP (SEQ ID NO:38).**

Existen dos alelos del gen IGKV 1-12. El número de acceso IMGT del alelo \*01 del gen IGKV1-12 es V01577. La secuencia de aminoácidos es:

**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTTTCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSL  
QSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP (SEQ ID NO:39).**

El número de acceso IMGT del alelo \*02 del gen IGKV1-12 es V01576. La secuencia de aminoácidos es:

**DIQMTQSPSSVSASVGDRVTTTCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSL  
QSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFP (SEQ ID NO:40).**

El número de acceso IMGT del gen IGKV1-9 es Z00013. La secuencia de aminoácidos es:

**DIQLTQSPSFLSASVGDRVTTTCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSTLQ  
SGVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYP (SEQ ID NO:41).**

El número de acceso IMGT del gen IGKV1-6 es M64858. La secuencia de aminoácidos es:

**AIQMTQSPSSLSASVGDRVTTTCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQ  
SGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYP (SEQ ID NO:42).**

Existen tres alelos del gen IGKV1-5. El número de acceso IMGT del alelo \*01 del gen IGKV1-5 es Z00001. La secuencia de aminoácidos es:

DIQMTQSPSTLSASVGDRTTICRASQSISSWLAWYQKPKGAPKLLIYDASSLI  
SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQYNSYS (SEQ ID NO:43).

Se identifican las siguientes secuencias de línea germinal de cadena pesada humana potencial y se pueden incorporar en una molécula de unión de la invención:

5 Existen diez alelos del gen IGHV2-5. El número de acceso IMGT del alelo \*01 del gen IGHV2-5 es X62111. La secuencia de aminoácidos es:

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALEWLALIYW  
NDDKRYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYY (SEQ ID NO:45).

El número de acceso IMGT del gen IGHV2-26 es M99648. La secuencia de aminoácidos es:

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSNARMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFS

NDEKSYSTSLKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATATYYCARI (SEQ ID  
NO:46).

10 Existen trece alelos del gen IGHV2-70. El número de acceso IMGT del alelo \*01 del gen IGHV2-70 es L21969. La secuencia de aminoácidos es:

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMVCVSWIRQPPGKALEWLALID  
WDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCARI (SEQ ID  
NO:47).

Existen cuatro alelos del gen IGHV4-30-2. El número de acceso IMGT del alelo \*01 del gen IGHV4-30-2 es L10089. La secuencia de aminoácidos es:

15 QLQLQESGSLVKPSQTLTLTCAVSGGSISSGGYSWSWIRQPPGKGLEWIGYIYH  
SGSTYYNPSLKSRTISVDRSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID  
NO:48).

Existen seis alelos del gen IGHV4-30-4. El número de acceso IMGT del alelo \*01 del gen IGHV4-30-4 es Z14238. La secuencia de aminoácidos es:

QVQLQESGPGLVKPSQTLTLTCTVSGGSISSGDYYWSWIRQPPGKGLEWIGYIYY  
SGSTYYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID  
NO:49).

20 Existen diez alelos del gen IGHV4-31. El número de acceso IMGT del alelo \*01 del gen IGHV2-5 es L10098. La secuencia de aminoácidos es:

QVQLQESGPGLVKPSQTLTLTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLEWIGYIY  
YSGSTYYNPSLKSLVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID  
NO:50).

Existen seis alelos del gen IGHV4-39. El número de acceso IMGT del alelo \*01 del gen IGHV4-39 es L10094. La secuencia de aminoácidos es:

**QLQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYS  
GSTYYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO:51).**

Existen ocho alelos del gen IGHV4-61. El número de acceso IMGT del alelo \*01 del gen IGHV4-61 es M29811. La secuencia de aminoácidos es:

**QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSVSSGSYYWSWIRQPPGKGLEWIGYTY  
YSGSTNYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID  
NO:52).**

- 5 Cada una de estas secuencias de línea germinal se puede utilizar para proporcionar las regiones de estructura para uso con uno o más 6C8 CDR.

Como se utiliza aquí, "estructuras canónicas" son conformaciones de bucle hipervariables conservadas hechas mediante diferentes CDR mediante los cuales la molécula de unión forma el antígeno de contacto. La asignación de las clases de estructura canónica a una nueva molécula de unión se puede lograr utilizando el software públicamente disponible.

En otra realización, la sustitución de los CDR de ratón en una estructura principal de dominio variable humano se basa en la retención de la orientación espacial correcta de la estructura principal de dominio variable de ratón al identificar las estructuras principales de dominio variable humanas que retendrán la misma conformación que las estructuras principales de dominio variable de ratón de las que se derivan los CDR. En una realización, esto se logra al obtener los dominios variables humanos de las moléculas de unión humanas cuyas secuencias de estructura principal exhiben un alto grado de identidad de secuencia con los dominios de estructura principal variable de murino de los que se derivan los CDR. Véase Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger et al., Protein Engineering 6:971 (1993) y Carter et al., WO 92/22653.

Preferiblemente la molécula de unión receptora humana retiene los residuos de interfaz y canónicos de la molécula de unión donante. Adicionalmente, la molécula de unión receptora humana preferiblemente tiene similitud sustancial en la longitud de los bucles CDR. Véase Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger et al., Protein Engineering 6:971 (1993) y Carter et al., WO 92/22653.

En otra realización, las secuencias receptoras humanas apropiadas se pueden seleccionar con base en la homología a las regiones de estructura de la molécula de unión 6C8. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la molécula de unión 6C8 se puede comparar con la secuencia de aminoácidos de otras moléculas de unión conocidas mediante, por ejemplo, al comparar las regiones FR o las secuencias de región variable de la secuencia de aminoácidos 6C8 contra una base de datos públicamente disponible de las moléculas de unión conocidas y seleccionar aquellas secuencias con el mayor porcentaje de identidad de aminoácidos en la región variable o FR, es decir, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99.5 %.

En una realización, se puede utilizar la secuencia de estructuras establecida en la SEQ ID NO: 67 (**QVTLKESGPGILQPSQTLTSLTCSFSGFSLSTSGMGVGVIRQPPGKLEWLAH** IWWDDDKYNPSLKSRLTISKDTSSNQVFLHITSVDTRDTATYYCARTRRYFPF AYWGEGTSVTVTS (SEQ ID NO: 67; los residuos de estructura principal están en negrilla)). En otra realización, se puede utilizar la secuencia de estructura principal establecida en la SEQ ID NO: 68 (**QVTLRESGPALVKPTQTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVIRQPPGKALEWLA** HIWWDDDKYNPSLKSRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYVCARTRY FPFAYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 68; los residuos de estructura principal están en negrilla)).

Se han identificado regiones determinantes de complementariedad de la inmunoglobulina donante de murino y las inmunoglobulinas receptoras humanas apropiadas, la siguiente etapa es para determinar cuáles, si existen, residuos de estos componentes se deben sustituir para optimizar las propiedades de la molécula de unión humanizada resultante. En general, se debe minimizar la sustitución de los residuos de aminoácido humanos con murino, debido a la introducción de los residuos de murino aumenta el riesgo de la molécula de unión de provocar una respuesta de anticuerpo anti-ratón humano (HAMA) en humanos. Se pueden desarrollar métodos reconocidos en la técnica para determinar la respuesta inmunológica para supervisar una respuesta HAMA en un paciente particular o durante ensayos clínicos. A los pacientes administrados a las moléculas de unión humanizadas se les puede dar un ensayo de inmunogenicidad al inicio y a lo largo de la administración de dicha terapia. Se mide la respuesta HAMA, por ejemplo, al detectar anticuerpos en el reactivo terapéutico humanizado, en muestras de suero del paciente utilizando

un método por un experto en la técnica, que incluyen tecnología de resonancia de plasmón de superficie (BIACORE) y/o análisis ELISA de fase sólida.

5 Cuando es necesario, se puede cambiar o sustituir uno o más residuos en las regiones de estructura principal humana con residuos en las posiciones correspondientes en el anticuerpo de murino con el fin de conservar la afinidad de unión del anticuerpo humanizado con el antígeno. Este cambio algunas veces se denomina "retromutación". Ciertos aminoácidos de los residuos de estructura principal de región variable humana se seleccionan para retromutación con base en su posible influencia en la conformación de CDR y/o unión a antígeno. El reemplazo de las regiones CDR de murino con la región de estructura variable humana puede resultar en restricciones conformacionales, que, a menos que se corrijan por sustitución ciertos residuos de aminoácido, conduce a pérdida de afinidad de unión.

15 En una realización, se puede determinar la selección de los residuos de aminoácido para retromutación, en parte, mediante modelado por ordenador, utilizando técnicas reconocidas en el arte. En general, se producen modelos moleculares partiendo de las estructuras resueltas para cadenas de inmunoglobulina o sus dominios. Las cadenas que se van a modelar se comparan con la similitud de la secuencia de aminoácidos con cadenas o dominios de las estructuras tridimensionales resueltas, y las cadenas o dominios que muestran la mayor similitud de secuencia se seleccionan como puntos de partida para construcción del modelo molecular. Las cadenas o dominios que comparten por lo menos 50 % de identidad de secuencia se seleccionan para modelado, y preferiblemente aquellas que comparten por lo menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 % de identidad de secuencia o más se seleccionan para modelado. Las estructuras de partida resueltas se modifican para permitir las diferencias entre los aminoácidos actuales en las cadenas de inmunoglobulina o los dominios se modelan, y aquellos en la estructura de partida. Las estructuras modificadas luego se ensamblan en una inmunoglobulina compuesta. Finalmente, el modelo se refina mediante minimización de energía y al verificar que todos los átomos están dentro de distancias apropiadas entre sí y que las longitudes de unión y ángulos están dentro de los límites químicamente aceptables.

25 La selección de los residuos de aminoácido para sustitución también se puede determinar, en parte, mediante examen de las características de los aminoácidos en ubicaciones particulares, u observación empírica de los efectos de sustitución o mutagenie de los aminoácidos particulares. Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un residuo de estructura principal de región variable de murino y un residuo de estructura principal de región variable humana seleccionada, el aminoácido de estructura principal humana se puede sustituir por el aminoácido de la estructura equivalente de la molécula de unión de ratón cuando se espera razonablemente que el aminoácido: (1) se une al antígeno no covalentemente directamente, (2) es adyacente a una región CDR, (3) de otra forma interactúa con una región CDR (por ejemplo, está dentro de aproximadamente 3-6 Å de una región CDR según se determina por modelado por ordenador), o (4) participa en la interfaz VL-VH.

35 Los residuos que "se unen al antígeno no covalentemente directamente" incluyen aminoácidos en posiciones en las regiones de estructura que tienen una buena probabilidad de interactuar directamente con los aminoácidos en el antígeno de acuerdo con las fuerzas químicas establecidas, por ejemplo, mediante unión de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, y similares.

40 Los residuos que son "adyacentes a una región CDR" incluyen los residuos de aminoácido en posiciones inmediatamente adyacentes a uno o más de los CDR en la secuencia primaria de la cadena de inmunoglobulina humanizada, por ejemplo, en posiciones inmediatamente adyacentes a un CDR como se define por Kabat, o un CDR como se define por Chothia (Véase por ejemplo, Chothia and Lesk JMB 196: 901 (1987)). Estos aminoácidos particularmente probablemente interactúan con los aminoácidos en los CDR y, si se seleccionan del receptor, pueden distorsionar los CDR de donante y reducir la afinidad. Más aún, los aminoácidos adyacentes pueden interactuar directamente con el antígeno (Amit et al., Science, 233:747 (1986)) y seleccionar estos aminoácidos del donante lo que puede ser deseable para mantener todo el antígeno en contacto lo que proporciona afinidad en la molécula de unión original.

50 Los residuos que "de otra forma interactúan con una región CDR" incluyen aquellos que se determinan mediante análisis estructural secundario que está en una orientación espacial suficiente para afectar una región CDR. En una realización, los residuos que "de otra forma interactúan con una región CDR" se identifican al analizar un modelo tridimensional de inmunoglobulina donante (por ejemplo, un modelo generado por ordenador). Un modelo tridimensional, normalmente de la molécula de unión donante original, muestra que ciertos aminoácidos fuera de los CDR se acercan a los CDR y tienen una buena probabilidad de interactuar con aminoácidos en los CDR mediante unión de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrófobas, etc. En aquellas posiciones de aminoácido, se puede seleccionar la inmunoglobulina donante aminoácido a diferencia de la inmunoglobulina receptora de aminoácido. Los aminoácidos de acuerdo con este criterio tendrán de manera general un átomo de cadena lateral dentro de aproximadamente 3Å de algún átomo en los CDR y puede contener un átomo que puede interactuar con los átomos CDR de acuerdo con las fuerzas químicas establecidas, tal como aquellas mencionadas anteriormente.

En el caso de átomos que pueden formar un enlace de hidrógeno, se mide el 3 Å entre su núcleo, pero para átomos que no forman un enlace, se mide el 3 Å entre sus superficies de Van der Waals. Por lo tanto, en el último caso, el núcleo puede estar dentro de aproximadamente 6 Å (3 Å más la suma de los radios de Van der Waals) para los átomos que se consideran capaces de interactuar. En muchos casos el núcleo será de 4 o 5 a 6 Å aparte. Al determinar si un aminoácido puede interactuar con los CDR, se prefiere no considerar los últimos 8 aminoácidos del CDR de cadena pesada como parte de los CDR, debido a que desde el punto de vista de estructura, estos 8 aminoácidos se comportan más como parte de la estructura principal.

Los aminoácidos que son capaces de interactuar con los aminoácidos en los CDR, se pueden identificar en aún otra forma. El área de superficie accesible de disolvente de cada aminoácido de estructura principal se calcula en dos formas: (1) en la molécula de unión intacta, y (2) en una molécula hipotética que consiste de la molécula de unión con sus CDR retirados. Una diferencia significativa entre estos números de aproximadamente 10 angstroms cuadrados o más muestra que el acceso del aminoácido de estructura principal a disolvente se bloquea por lo menos parcialmente mediante los CDR, y por lo tanto que el aminoácido hace contacto con los CDR. El área de superficie accesible al disolvente de un aminoácido se puede calcular con base en un modelo tridimensional de una molécula de unión, utilizando los algoritmos conocidos en la técnica (por ejemplo, Connolly, J. Appl. Cryst. 16:548 (1983) y Lee and Richards, J. Mol. Biol. 55:379 (1971)). Los aminoácidos de estructura principal también pueden interactuar ocasionalmente con los CDR indirectamente, al afectar la conformación de otro aminoácido de estructura principal que a su vez contacta los CDR.

Se sabe que los aminoácidos en diversas posiciones en la estructura son capaces de interactuar con los CDR en muchas moléculas de unión (Chothia and Lesk, supra, Chothia et al., supra y Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990)). Notablemente, se sabe que los aminoácidos en las posiciones 2, 48, 64 y 71 de la cadena ligera y 26-30, 71 y 94 de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat) son capaces de interactuar con los CDR en muchas moléculas de unión. Los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada también probablemente interactúan con los CDR. En todas estas posiciones numeradas, se prefiere la elección del aminoácido donante a diferencia del aminoácido receptor (cuando difieren) que está en la inmunoglobulina humanizada. De otra parte, ciertos residuos capaces de interactuar con la región CDR, tal como los primeros 5 aminoácidos de la cadena ligera, algunas veces se pueden seleccionar de la inmunoglobulina receptora sin pérdida de afinidad en la molécula de unión humanizada.

Los residuos que "participan en la interfaz VL-VH" o "residuos de empaque" incluyen aquellos residuos en la interfaz entre VL y VH según se define, por ejemplo, por Novotny and Haber (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985)) o Chothia et al, supra. De manera general, los residuos de empaque inusuales se deben retener en la molécula de unión humanizada si difieren de aquellos en las estructuras humanas.

En general, se sustituye uno o más de los aminoácidos cumplen los criterios anteriores. En algunas realizaciones, se sustituyen todos o la mayor parte de los aminoácidos que cumplen los criterios anteriores. Ocasionalmente, se presenta alguna ambigüedad aproximadamente si un aminoácido particular cumple con los criterios anteriores, y se producen las moléculas de unión variantes alternativas, una de las cuales tiene esta sustitución particular, la otra de las cuales no. Las moléculas de unión variantes alternativas así producidas se pueden probar en cualquiera de los ensayos descritos aquí para la actividad deseada, y la molécula de unión seleccionada preferida.

Usualmente las regiones CDR en las moléculas de unión humanizadas son sustancialmente idénticas, y más usualmente, idénticas a las regiones CDR correspondientes de la molécula de unión donante. Aunque no es usualmente deseable, es algunas veces posible hacer una o más sustituciones de aminoácido conservadoras de los residuos CDR sin afectar apreciablemente la afinidad de unión de la molécula de unión humanizada resultante. Sustituciones conservadoras significa combinaciones tal como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr.

Los candidatos adicionales para sustitución son aminoácidos de estructura principal humana receptores que son inusuales o "raros" para una inmunoglobulina humana en esta posición. Estos aminoácidos se pueden sustituir con aminoácidos de la posición equivalente de la molécula de unión donante de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Por ejemplo, puede ser deseable la sustitución cuando el aminoácido en una región de estructura humana principal de la inmunoglobulina receptora es rara para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es común para esa posición en las secuencias de inmunoglobulina humana; o cuando el aminoácido en la inmunoglobulina receptora es raro para esta posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante también es raro, con relación a otras secuencias humanas. Este criterio ayuda a asegurar que un aminoácido atípico en la estructura principal humana no interrumpe la estructura de molécula de unión. Más aún, al reemplazar un aminoácido receptor humano inusual con un aminoácido de la molécula de unión donante que ocurre por ser típico para las moléculas de unión humanas, la molécula de unión humanizada se puede hacer menos inmunogénica.

5 El término "raro", como se utiliza aquí, indica un aminoácido que ocurre en esa posición en menos de aproximadamente 20 % pero usualmente menos de aproximadamente 10 % de las secuencias en una muestra representativa de las secuencias, y el término "común", como se utiliza aquí, indica un aminoácido que ocurre en más de aproximadamente 25 % pero usualmente más de aproximadamente 50 % de las secuencias en una muestra representativa. Por ejemplo, todas las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada humana se agrupan respectivamente en "subgrupos" de las secuencias que son especialmente homólogas entre sí y tienen los mismos aminoácidos en ciertas posiciones críticas (Kabat et al., supra). Cuando se decide si un aminoácido en una secuencia receptora humana es "raro" o "común" entre las secuencias humanas, frecuentemente será preferible considerar solo aquellas secuencias humanas en el mismo subgrupo como la secuencia receptora.

10 Los candidatos adicionales para sustitución son aminoácidos de estructura principal humana receptora que se identificarían como parte de una región CDR bajo la definición alternativa propuesta por Chothia et al., supra. Los candidatos adicionales para sustitución son aminoácidos de estructura principal humana receptores que se identificarían como parte de una región CDR bajo el AbM y/o las definiciones de contacto. Notablemente, el CDR1 en la cadena pesada variable se define como que incluye los residuos 26-32.

15 Los candidatos adicionales para sustitución son residuos de estructura receptores que corresponden a un residuo de estructura donante inusual o raro. Los residuos de estructura donante inusual o raro son aquellos que son raros o inusuales (como se define aquí) para moléculas de unión de murino en esa posición. Para moléculas de unión de murino, el subgrupo se puede determinar de acuerdo con Kabat y las posiciones de residuo identificadas que difieren del consenso. Estas diferencias específicas de donante pueden apuntar a mutaciones somáticas en la  
20 secuencia de murino que mejora la actividad. Los residuos inusuales que se predice afectan la unión se retienen, mientras que se pueden sustituir los residuos predichos que no son importantes para unión.

Los candidatos adicionales para sustitución son residuos de línea no germinal que ocurren en una región de estructura receptora. Por ejemplo, cuando una cadena de molécula de unión receptora (es decir, una cadena humana de molécula de unión que comparte identidad de secuencia significativa con la cadena de molécula de  
25 unión donante) se alinea con una cadena de molécula de unión de línea germinal (de la misma forma comparte identidad de secuencia significativa con la cadena donante), los residuos que no coinciden entre la estructura principal de cadena receptora y la estructura de cadena de línea germinal se pueden sustituir con los residuos correspondientes de la secuencia de línea germinal.

A diferencia de las sustituciones de aminoácido específicas discutidas anteriormente, las regiones de estructura principal de las moléculas de unión humanizadas son usualmente sustancialmente idénticas, y más usualmente, idénticas a la región de estructura principal de las moléculas de unión humanas de las que se derivan. Por supuesto, muchos de los aminoácidos en la región de estructura hacen poca o no hacen contribución directa con la especificidad o afinidad de una molécula de unión. Sin embargo, se pueden tolerar muchas sustituciones conservadoras individuales de residuos de estructura principal sin cambio apreciable de la especificidad o afinidad  
30 de la molécula de unión humanizada resultante. Sin embargo, en una realización la región de estructura principal variable de la molécula de unión humanizada comparte por lo menos 85 % de identidad de secuencia con una secuencia de la región de estructura principal variable humana o consenso de dichas secuencias. En otra realización, la región de estructura principal variable de la molécula de unión humanizada comparte por lo menos 90 %, preferiblemente 95 %, más preferiblemente 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con una  
35 secuencia de región de estructura principal variable humana o consenso de dichas secuencias. En general, sin embargo, son deseables dichas sustituciones.

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende adicionalmente por lo menos una retromutación de un residuo de aminoácido humano al residuo de aminoácido de ratón correspondiente en donde el residuo de aminoácido es un residuo de empaque de interfaz. Los "residuos de empaque de interfaz" incluyen  
40 aquellos residuos en la interfaz entre VL y VH como se define, por ejemplo, mediante Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 4592-66 (1985).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende adicionalmente por lo menos una retromutación de un residuo de aminoácido humano con el residuo de aminoácido de ratón correspondiente es un residuo canónico. Los "residuos canónicos" son residuos de estructura principal conservados dentro de una clase canónica o estructural conocida por ser importante para la conformación de CDR (Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990)). Los residuos canónicos incluyen 2, 25, 27B, 28, 29, 30, 33, 48, 51, 52, 64, 71, 90, 94 y 95 de la cadena ligera y residuos 24, 26, 27, 29, 34, 54, 55, 71 y 94 de la cadena pesada. Los residuos adicionales (por ejemplo, residuos determinantes de estructura CDR) se pueden identificar de acuerdo con la metodología de Martin y Thorton (1996) J. Mol. Biol. 263:800.  
50

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende adicionalmente por lo menos una retromutación de un residuo de aminoácido humano al residuo de aminoácido de ratón correspondiente en donde el residuo de aminoácido está en una posición capaz de interactuar con un CDR. Notablemente, se sabe que los aminoácidos en las posiciones 2, 48, 64 y 71 de la cadena ligera y 26-30, 71 y 94 de la cadena pesada (numeración de acuerdo con Kabat) son capaces de interactuar con los CDR en muchos anticuerpos. Los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada también interactúan probablemente con los CDR.

Con base en análisis CLUSTAL W, se identifican diversos residuos de aminoácido en la estructura principal humana para sustitución potencial, por ejemplo, con los residuos de aminoácido correspondientes de la cadena ligera 6C8. Estos incluyen las posiciones 1, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 43, 45, 46, 58, 60, 63, 70, 76, 77, 78, 79, 83, 8S, 87, 100, y 104.

En una realización, una estructura de cadena ligera variable de una molécula de unión de la invención comprende adicionalmente por lo menos una sustitución de un residuo de aminoácido humano con un residuo de aminoácido de ratón correspondiente seleccionado del grupo que consiste de: E1D (es decir, el E en la posición 1 del anticuerpo injertado CDR que comprende CDR de murino y las regiones humanas FR se mutan en un D, que es el residuo de aminoácido correspondiente en el anticuerpo 6C8), P8Q, A9K, T10F, L11M, V13T, P15V, E17D, A19V, T20S, L21V, S22T, A43S, R45K, L46A, I58V, A60D, S63T, E70D, S76N, S77N, L78V, Q79H, F83L, V85E, Y87F, G100A, y V104L.

Con base en el análisis CLUSTAL W, se identifican diversos residuos de aminoácido en la estructura principal humana para sustitución potencial, por ejemplo, con los residuos de aminoácido correspondientes de la cadena pesada 6C8. Estas posiciones incluyen 5, 10, 11, 12, 15, 19, 23, 43, 46, 68, 77, 81, 83, 84, 86, 87, 89, 90, y 92.

En una realización, una estructura principal de cadena pesada variable de una molécula de unión de la invención comprende adicionalmente por lo menos una sustitución de un residuo de aminoácido humano con el residuo de aminoácido de ratón correspondiente seleccionado del grupo que consiste de: R5K (es decir, la R en la posición 5 del anticuerpo injertado CDR que comprende CDR de murino y las regiones humanas FR se mutan con un K, que es el residuo de aminoácido correspondiente en el anticuerpo 6C8), A10G, L11I, V12L, T15S, T19S, T23S, P43S, A46G, R68Q, K77R, V81F, T83K, M84I, N86S, M87V, P89T, V90A, y T92A.

Las moléculas de unión humanizadas exhiben preferiblemente una afinidad de unión específica para antígeno de por lo menos  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  o  $10^{10}$   $M^{-1}$ . Usualmente el límite superior de la afinidad de unión de las moléculas de unión humanizadas para antígeno está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de aquellas inmunoglobulinas donantes. Frecuentemente el límite inferior de afinidad de unión también está dentro de un factor de tres, cuatro o cinco de aquellos donantes de inmunoglobulina. Alternativamente, la afinidad de unión se puede comparar con aquella de una molécula de unión humanizada que no tiene sustituciones (por ejemplo, una molécula de unión que tiene CDR donantes y FR receptores, pero no sustituciones FR). En dichos casos, la unión de la molécula de unión optimizada (con sustituciones) es preferiblemente por lo menos dos a tres veces mayor, o tres a cuatro veces mayor, que aquella de la molécula de unión no sustituida. Para hacer comparaciones, la actividad de diversas moléculas de unión se puede determinar, por ejemplo, mediante BIACORE (es decir, resonancia de plasmón de superficie utilizando reactivos no marcados) o ensayos de unión competitiva.

Se han seleccionado conceptualmente los componentes de CDR y de estructura principal de las moléculas de unión humanizadas, está disponible una variedad de métodos para producir dichas moléculas de unión. Debido a la degeneración del código, se codificará una variedad de secuencias de ácido nucleico cada molécula de unión de la secuencia de aminoácido. Las secuencias de ácido nucleico deseada se pueden producir mediante síntesis de ADN de fase sólida de novo o mediante mutagenie PCR de una variante preparada más temprana del polinucleótido deseado.

La mutagenie mediada por oligonucleótido es un método preferido para preparar variantes de sustitución, eliminación e inserción de ADN de polipéptido objetivo. Véase Adelman et al. (DNA 2:183 (1983)). En resumen, el ADN de polipéptido objetivo se altera al hibridar un oligonucleótido que codifica la mutación deseada con una plantilla de ADN de hebra sencilla. Después de hibridación, se utiliza una polimerasa de ADN para sintetizar una segunda hebra complementaria completa de la plantilla que incorpora el cebador de oligonucleótido, y codifica la alteración seleccionado en el ADN de polipéptido objetivo.

Los segmentos variables de las moléculas de unión producidas como se describe supra (por ejemplo, las regiones variables de cadena pesada y ligera de moléculas de unión quiméricas, humanizadas, o humanas) se ligan normalmente a por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Se pueden aislar las secuencias de ADN de la región constante humana de acuerdo con los procedimientos bien conocidos de una variedad de células humanas, pero células B preferiblemente

inmortalizadas (véase Kabat et al., supra, y Liu et al., W087/02671). De forma ordinaria, la molécula de unión contendrá las regiones constantes de cadena ligera y cadena pesada. La región constante de cadena pesada usualmente incluye las regiones CH1, pivote, CH2, CH3, y CH4. Una molécula de unión descrita aquí incluye anticuerpos que tienen todos los tipos de regiones constantes, que incluyen IgM, IgG, IgD, IgA y IgE, y cualquier isotipo, que incluye IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4. La elección de la región constante depende, en parte, o si se desea toxicidad mediada celular y/o complemento dependiente de la molécula de unión. Por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad de complemento y los isotipos IgG2 y IgG4 no. Cuando se desea que la molécula de unión (por ejemplo, molécula de unión humanizada) exhiba actividad citotóxica, el dominio constante es usualmente un dominio constante de fijación de complemento y la clase es normalmente IgG1. Cuando dicha actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante puede ser, por ejemplo, de la clase IgG2. La elección del isotipo también puede afectar el pasaje del anticuerpo en el cerebro. Se prefiere el IgG1 de isotipo humano. Las regiones constantes de cadena ligera pueden ser lambda o kappa. La molécula de unión humanizada puede comprender las secuencias de más de una clase o isotipo. Las moléculas de unión se pueden expresar como tetrámeros que contienen dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, cuando las cadenas pesadas separadas, cadenas ligeras, como Fab, Fab' F(ab')<sub>2</sub>, y Fv, o como moléculas de unión de cadena única en la que los dominios variables de cadena ligera y pesada se ligan a través de un separador.

### III. Producción de las moléculas de unión

La presente invención caracteriza las moléculas de unión que tienen especificidad para GITR, por ejemplo, el GITR humano. Se pueden utilizar dichas moléculas de unión, en la formulación de diversas composiciones terapéuticas de la invención o, preferiblemente, proporcionan regiones determinantes de complementariedad para la producción de las moléculas de unión humanizadas o quiméricas (descritas en detalle adelante). La producción de las moléculas de unión monoclonales no humanas, por ejemplo, murino, conejillo de indias, primate, conejo o rata, se puede llevar a cabo, por ejemplo, al inmunizar el animal con GITR o con una molécula de ácido nucleico que codifica GITR. Por ejemplo, la molécula de unión 6C8 se hace al reemplazar el gen que codifica el GITR humano en un vector de expresión e inmunizar animales. También se puede utilizar un polipéptido más largo que comprende GITR o un fragmento inmunogénico de GITR o molécula de unión anti-idiotípica de GITR. (Véase, por ejemplo, Harlow & Lane, supra.). Dicho inmunógeno se puede obtener a partir de una fuente natural, mediante síntesis de péptido o mediante expresión recombinante. Opcionalmente, el inmunógeno se puede administrar, fusionar o de otra forma complejar con una proteína portadora, como se describe adelante. Opcionalmente, el inmunógeno se puede administrar con un adyuvante. El término "adyuvante" se refiere a un compuesto que cuando se administra en conjunto con un antígeno que aumenta la respuesta inmunológica al antígeno, pero cuando se administra solo no genera una respuesta inmunológica al antígeno. Los adyuvantes pueden aumentar una respuesta inmunológica mediante diversos mecanismos que incluyen reclutamiento de linfocitos, estímulo de células B y/o células T, y estímulo de macrófagos. Diversos tipos de adyuvantes se pueden utilizar como se describe adelante. El adyuvante de Freund completo seguido por adyuvante incompleto se prefiere para inmunización de animales de laboratorio.

Los conejos o conejillos de indias se utilizan normalmente para hacer moléculas de unión policlonales. La preparación de las moléculas de unión policlonales de ejemplo, por ejemplo, para protección pasiva, se puede realizar como sigue. Los animales se inmunizan con 100 mg de GITR, más adyuvante, y se les practica la eutanasia en 4-5 meses. La sangre se recolecta y el IgG se separa de otros componentes de sangre. Las moléculas de unión específicas para el inmunógeno se pueden purificar parcialmente mediante cromatografía de afinidad. Se obtiene un promedio de aproximadamente 0.5-1.0 mg de la molécula de unión específica de inmunógeno por animal, que da un total de 60-120 mg.

Los ratones se utilizan normalmente para elaborar las moléculas de unión monoclonales. Los monoclonales se pueden preparar contra un fragmento al inyectar el fragmento o forma más larga de GITR en un ratón, preparar hibridomas y detectar los hibridomas para una molécula de unión que se une específicamente a GITR. Opcionalmente, las moléculas de unión se detectan para unión a una región específica o fragmento deseado de GITR sin unión a otros fragmentos no overlapping de GITR. La última detección se puede llevar a cabo al determinar la unión de una molécula de unión en una colección de mutantes de eliminación de un péptido GITR y determinar cuáles mutantes de eliminación se unen a la molécula de unión. Se puede evaluar la unión, por ejemplo, mediante Western blot o ELISA. El fragmento más pequeño para mostrar la unión específica a la molécula de unión define el epítipo de la molécula de unión. Alternativamente, se puede determinar la especificidad del epítipo mediante un ensayo de competencia en el que una prueba y molécula de unión de referencia compite para unión al GITR. Si la molécula de unión de prueba o referencia compite, entonces se pueden unir al mismo epítipo (o epítopos suficientemente próximos) de tal manera que la unión de una molécula de unión interfiere con la unión de la otra. El isotipo preferido para dichas moléculas de unión es el isotipo IgG2a de ratón o el isotipo equivalente en otras especies. El isotipo IgG2a de ratón es el equivalente del isotipo IgG1 humano.

En otra realización, el ADN que codifica una molécula de unión se puede aislar y secuenciar fácilmente utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, al utilizar sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de las moléculas de unión de murino). Las células de hibridoma aisladas y subclonadas sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede poner en vectores de expresión, que luego se transfectan en células anfitrionas procarióticas o eucarióticas tal como células *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra forma inmunoglobulinas. Más particularmente, el ADN aislado (que puede ser sintético como se describe aquí) se puede utilizar para clonar las secuencias de región constante y región variable para la fabricación de las moléculas de unión como se describe en Newman et al., Patente Estadounidense No. 5,658,570, presentado en Enero 25, 1995. Esencialmente, eso supone la extracción del ARN de las células seleccionadas, conversión a cADN, y amplificación mediante PCR utilizando cebadores específicos Ig. Los cebadores adecuados para este propósito también se describen en la Patente Estadounidense No. 5,658,570. Las células transformadas que expresan el anticuerpo deseado se pueden producir en cantidades relativamente grandes para proporcionar suministros clínicos y comerciales de la molécula de unión.

Aquellos expertos en la técnica también apreciarán que el ADN que codifica las moléculas de unión o fragmentos de las mismas (por ejemplo, sitios de unión de antígeno) también se pueden derivar de colecciones de fago de anticuerpo, por ejemplo, utilizando fago pd o tecnología de fagémido Fd. Los métodos de ejemplo se establecen, por ejemplo, en el documento EP 368 684 B1; patente Estadounidense 5,969,108, Hoogenboom, H.R. y Chames. 2000. *Immunol. Today* 21:371; Nagy et al. 2002. *Nat. Med.* 8:801; Huie et al. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:2682; Lui et al. 2002. *J. Mol. Biol.* 315:1063. Diversas publicaciones (por ejemplo, Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992)) han descrito la producción de las moléculas de unión de alta afinidad humanas mediante mezcla de cadena, así como también infección combinatoria y recombinación in vivo como una estrategia para construir colecciones de fago grandes. En otra realización, se puede utilizar exhibición ribosómica para reemplazar el bacteriófago como la plataforma de exhibición (véase, por ejemplo, Hanes et al. 2000. *Nat. Biotechnol.* 18: 1287; Wilson et al. 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3750; o Irving et al. 2001 *J. Immunol. Methods* 248:31. En todavía otra realización, se pueden detectar colecciones de superficie celular para las moléculas de unión (Boder et al. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10701; Daugherty et al. 2000 *J. Immunol. Methods* 243: 211. Dichos procedimientos proporcionan alternativas para las técnicas de hibridoma tradicionales para el aislamiento y posterior clonación de las moléculas de unión monoclonales.

Todavía otras realizaciones de la presente invención comprenden la generación d moléculas de unión humanas o sustancialmente humanas en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son incapaces de producción de inmunoglobulina endógena (véase por ejemplo, Patente Estadounidense Nos. 6,075,181, 5,939,598, 5,591,669 y 5,589,369). Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigota de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de línea germinal resulta en inhibición completa de la producción endógena de anticuerpo. La transferencia de una disposición de gen de inmunoglobulina humana a dichos ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de humano las moléculas de unión luego de exposición al antígeno. Otro medio preferido para generar moléculas de unión humanas utilizando ratones SCID se describe en la Patente Estadounidense No. 5,811,524. Se apreciará que el material genético asociado con estas moléculas de unión humanas también se puede aislar y manipular como se describe aquí.

Todavía otro medio altamente eficiente para generar moléculas de unión recombinantes se describe por Newman, *Biotechnology*, 10: 1455-1460 (1992). Específicamente, esta técnica resulta en la generación de moléculas de unión primatizadas que contienen dominios variables de mono y las secuencias constantes humanas. Más aún, esta técnica también se describe en la Patente Estadounidense Nos. 5,658,570, 5,593,780 y 5,756,096.

En otra realización, los linfocitos se pueden seleccionar mediante micromanipulación y se aíslan los genes variables. Por ejemplo, se pueden aislar células mononucleares de sangre periférica de un mamífero inmunizado y se cultivan durante aproximadamente 7 días in vitro. Los cultivos se pueden detectar para los IgG específicos que cumplen los criterios de detección. Se pueden aislar células de pozos positivos. Se pueden aislar células B que producen Ig individual mediante FACS o al identificarlas en un ensayo de placa hemolítica mediada por complemento. Las células B que producen Ig se pueden micromanipular en un tubo y se pueden amplificar los genes VH y VL utilizando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes VH y VL se pueden clonar en un vector de expresión de anticuerpo y se transfectan en células (por ejemplo, células eucarióticas o procarióticas) para expresión.

Más aún, las secuencias genéticas útiles para producir los polipéptidos de la presente invención se pueden obtener de un número de diferentes fuentes. Por ejemplo, como se discutió extensamente anteriormente, está disponible una variedad de genes de anticuerpo humano en la forma de depósitos públicamente accesibles. Se han publicado muchas secuencias de anticuerpos y genes que codifican el anticuerpo y los genes de anticuerpo adecuados se pueden sintetizar químicamente de estas secuencias utilizando técnicas reconocidas en el arte. Las técnicas de síntesis de oligonucleótido compatibles con este aspecto de la invención se conocen bien por el experto y se pueden

llevar a cabo utilizando cualquiera de los diversos sintetizadores automáticamente disponibles. Adicionalmente, las secuencias de ADN que codifican diversos tipos de cadenas pesada y ligera establecidas aquí se pueden obtener a través de los servicios de vendedores de síntesis de ADN comercial. El material genético obtenido utilizando cualquiera de los métodos anteriores luego se puede alterar o sintetizar para proporcionar los polipéptidos obtenidos de la presente invención.

Alternativamente, se pueden seleccionar estirpes celulares que producen anticuerpo y se cultivan utilizando técnicas bien conocidas por el experto. Dichas técnicas se describen en una variedad de manuales de laboratorio y publicaciones primarias. A este respecto, las técnicas adecuadas para uso en la invención como se describe adelante se describen en *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley y Sons, New York (1991), que incluyen complementos.

Como se conoce bien, el ARN se puede aislar de las células de hibridoma originales o de otras células transformadas mediante técnicas estándar, tal como extracción de isotiocianato de guanidinio y precipitación seguido por centrifugación o cromatografía. Cuando es deseable, se puede aislar el mRNA del ARN total mediante técnicas estándar tal como cromatografía en una oligo dT celulosa. Las técnicas adecuadas con familiares en el arte.

En una realización, los cADN que codifican las cadenas ligera y pesada de la molécula de unión se pueden hacer, ya sea simultáneamente o en forma separada, utilizando transcriptasa inversa y polimerasa de ADN de acuerdo con métodos bien conocidos. Se puede iniciar PCR mediante cebadores de región constante consensus o mediante cebadores más específicos con base en el ADN de cadena ligera y pesada publicado y las secuencias de aminoácido. Como se discutió anteriormente, el PCR también se puede utilizar para aislar clones de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de la molécula de unión. En este caso las colecciones se pueden detectar mediante cebadores consensus o sondas homólogas más grandes, tal como sondas de región constante de ratón.

El ADN, normalmente ADN de plásmido, se puede aislar de las células utilizando técnicas conocidas en el arte, mapeo de restricción y secuenciado de acuerdo con técnicas estándar, bien conocidas establecidas en detalle, por ejemplo, en las referencias anteriores con relación a técnicas de ADN recombinante. Por supuesto, el ADN puede ser sintético de acuerdo con la presente invención en cualquier punto durante el proceso de aislamiento o análisis posterior.

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende o consiste de un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. El término "fragmento de unión a antígeno" se refiere a un fragmento de polipéptido de una inmunoglobulina o anticuerpo que une un antígeno o compete con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que se deriva) para unión de antígeno (es decir, unión específica). Como se utiliza aquí, el término "fragmento" de una molécula de anticuerpo incluye fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, por ejemplo, una cadena ligera a anticuerpo (VL), una cadena pesada de anticuerpo (VH, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), un fragmento (Fab)<sub>2</sub>, un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv, y un fragmento de anticuerpo de dominio único (DAb). Se pueden obtener fragmentos, por ejemplo, por medio de tratamiento químico o enzimático de un anticuerpo intacto o completo o cadena de anticuerpo o mediante medios recombinantes.

En una realización, una molécula de unión de la invención es un anticuerpo modificado o construido por ingeniería. Las formas construidas con ingeniería de los anticuerpos incluyen, por ejemplo, minicuerpos, diacuerpos, diacuerpos fusionados a moléculas CH<sub>3</sub>, anticuerpos tetravalentes, intradiacuerpos (por ejemplo, Jendreyko et al. 2003. *J. Biol. Chem.* 278:47813), anticuerpos biespecíficos, proteínas de fusión (por ejemplo, proteínas de fusión de citoquina de anticuerpo) o, anticuerpos biespecíficos. Se describen otras inmunoglobulinas (Ig) y ciertas variantes de las mismas, por ejemplo en la Patente Estadounidense No. 4,745,055; documento EP 256,654; Faulkner et al., *Nature* 298:286 (1982); documento EP 120,694; documento EP 125,023; Morrison, *J. Immunol.* 123: 793 (1979); Kohler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197 (1980); Raso et al., *Cáncer Res.* 41:2073 (1981); Morrison et al., *Ann. Rev. Immunol.* 2:239 (1984); Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851 (1984); documento EP 255,694; documento EP 266,663; y documento WO 88/03559. También se conocen las cadenas de inmunoglobulina Reassorted. Véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,444,878; documento WO 88/03565; y documento EP 68,763 y referencias citadas allí.

En una realización, los anticuerpos modificados de la invención son minicuerpos. Los minicuerpos son moléculas diméricas hechas de dos cadenas de polipéptido cada una comprende una molécula ScFv (un polipéptido único que comprende uno o más sitios de unión a antígeno, por ejemplo, un dominio VL ligado por un ligador flexible a un dominio VH fusionado a un dominio CH<sub>3</sub> por medio de un péptido de conexión).

Se pueden construir moléculas ScFv en una orientación VH-ligador-VL u orientación VL-ligador-VH.

La bisagra flexible que liga los dominios VL y VH que hacen el sitio de unión a antígeno preferiblemente comprende de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 residuos de aminoácido. Un péptido de conexión de ejemplo para este propósito es (Gly4Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 17) (Huston et al. 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879). Se conocen en la técnica otros péptidos de conexión.

- 5 Se conocen bien en la técnica métodos para elaborar anticuerpos de cadena sencilla, por ejemplo, Ho et al. 1989. Gene 77:51; Bird et al. 1988 Science 242:423; Pantoliano et al. 1991. Biochemistry 30:10117; Milenic et al. 1991. Cáncer Research 51: 6363; Takkinen et al. 1991. Protein Engineering 4:837.

10 Se pueden hacer minicuerpos al construir un componente ScFv y el componente del péptido-CH3 de conexión utilizando los métodos descritos en la técnica (véase, por ejemplo, patente Estadounidense 5,837,821 o documento WO 94/09817A1). Estos componentes se pueden aislar de plásmidos separados como fragmentos de restricción y luego se ligan y se vuelven a clonar en un vector apropiado. Se puede verificar el ensamble apropiado mediante digestión de restricción y análisis de secuencia ADN.

15 Los diacuerpos son similares a moléculas scFv, pero tienen usualmente un ligador de residuo de aminoácido corto (menor de 10 y preferiblemente 1-5) que conecta ambos dominios V, de tal manera que los dominios VL y VH en la misma cadena de polipéptido no puede interactuar. En su lugar, el dominio VL y VH de una cadena de polipéptido interactúa con el dominio VH y VL (respectivamente) en una segunda cadena de polipéptido (WO 02/02781). En una realización, una molécula de unión de la invención es un diacuerpo fusionado a por lo menos una porción de la cadena pesada. En una realización preferida, una molécula de unión de la invención es un diacuerpo fusionado del dominio CH3.

20 Otras formas de anticuerpos modificados también están dentro del alcance de la invención actual (por ejemplo, documento WO 02/02781 A1; 5,959,083; 6,476,198 B1; documento US 2002/0103345 A1; documento WO 00/06605; Byrn et al. 1990. Nature. 344:667-70; Chamow and Ashkenazi. 1996. Trends Biotechnol. 14:52).

25 En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región constante de inmunoglobulina. Se sabe en la técnica que la región constante media diversas funciones efectoras. Por ejemplo, la unión del componente C1 de complemento con las moléculas de unión activa el sistema de complemento. La activación de complemento es importante en la opsonización y lisis de patógenos celulares. La activación de complemento también estimula la respuesta inflamatoria y también puede estar implicada en hipersensibilidad autoinmune. Adicionalmente, las moléculas de unión se unen a las células por medio de la región Fc, con un sitio del receptor Fc en la región de la molécula de unión Fc que se una a un receptor Fc (FcR) en una célula. Se presenta una serie de receptores Fc que son específicos para diferentes clases de moléculas de unión, que incluyen IgG (receptores gamma), IgE (receptores épsilon), IgA (receptores alfa) e IgM (receptores mu). La unión de molécula de unión a los receptores Fc en las superficies celulares activa una serie de respuestas biológicas importantes y diversas que incluyen inmersión y destrucción de las partículas cubiertas con la molécula de unión, depuración de complejos inmunes, lisis de células objetivo cubiertas con la molécula de unión mediante células asesinas (denominado citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo, o ADCC), liberación de mediadores inflamatorios, transferencia placentaria y control de la producción de inmunoglobulina.

35 En una realización, las funciones efectoras se pueden eliminar o reducir al utilizar una región constante de un molécula de unión IgG4, que se considera es incapaz de agotar las células objetivo, o hacer variantes Fc, en donde los residuos en la región Fc crítica para las funciones efectoras se mutan utilizando técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,585,097. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones de punto u otro medio) de un dominio de región constante puede reducir la unión del receptor Fc de la molécula de unión modificada circulante aumentando por lo tanto la localización del tumor. En otros casos puede ser las modificaciones de la región constante consistentes con la invención actual moderen la unión de cumplimiento y así reduzcan la vida útil del suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Todavía otras modificaciones de la región constante se pueden utilizar para modificar enlaces de disulfuro o unidades estructurales de oligosacárido que permite la localización mejorada debido a la especificidad aumentada del antígeno o la flexibilidad de la molécula de unión. Más generalmente, aquellos expertos en la técnica se darán cuenta de que las moléculas de unión modificadas como se describe aquí pueden ejercer una serie de efectos delicados que pueden o no ser apreciados fácilmente. Sin embargo el perfil fisiológico resultante, biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tal como localización de tumor, biodistribución y vida útil del suero, se puede medir fácilmente y cuantificar utilizando técnicas inmunológicas bien conocidas sin la debida experimentación.

40 En una realización, las funciones efectoras se pueden eliminar o reducir al utilizar una región constante de un molécula de unión IgG4, que se considera es incapaz de agotar las células objetivo, o hacer variantes Fc, en donde los residuos en la región Fc crítica para las funciones efectoras se mutan utilizando técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,585,097. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones de punto u otro medio) de un dominio de región constante puede reducir la unión del receptor Fc de la molécula de unión modificada circulante aumentando por lo tanto la localización del tumor. En otros casos puede ser las modificaciones de la región constante consistentes con la invención actual moderen la unión de cumplimiento y así reduzcan la vida útil del suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Todavía otras modificaciones de la región constante se pueden utilizar para modificar enlaces de disulfuro o unidades estructurales de oligosacárido que permite la localización mejorada debido a la especificidad aumentada del antígeno o la flexibilidad de la molécula de unión. Más generalmente, aquellos expertos en la técnica se darán cuenta de que las moléculas de unión modificadas como se describe aquí pueden ejercer una serie de efectos delicados que pueden o no ser apreciados fácilmente. Sin embargo el perfil fisiológico resultante, biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tal como localización de tumor, biodistribución y vida útil del suero, se puede medir fácilmente y cuantificar utilizando técnicas inmunológicas bien conocidas sin la debida experimentación.

45 En una realización, las funciones efectoras se pueden eliminar o reducir al utilizar una región constante de un molécula de unión IgG4, que se considera es incapaz de agotar las células objetivo, o hacer variantes Fc, en donde los residuos en la región Fc crítica para las funciones efectoras se mutan utilizando técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,585,097. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones de punto u otro medio) de un dominio de región constante puede reducir la unión del receptor Fc de la molécula de unión modificada circulante aumentando por lo tanto la localización del tumor. En otros casos puede ser las modificaciones de la región constante consistentes con la invención actual moderen la unión de cumplimiento y así reduzcan la vida útil del suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Todavía otras modificaciones de la región constante se pueden utilizar para modificar enlaces de disulfuro o unidades estructurales de oligosacárido que permite la localización mejorada debido a la especificidad aumentada del antígeno o la flexibilidad de la molécula de unión. Más generalmente, aquellos expertos en la técnica se darán cuenta de que las moléculas de unión modificadas como se describe aquí pueden ejercer una serie de efectos delicados que pueden o no ser apreciados fácilmente. Sin embargo el perfil fisiológico resultante, biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tal como localización de tumor, biodistribución y vida útil del suero, se puede medir fácilmente y cuantificar utilizando técnicas inmunológicas bien conocidas sin la debida experimentación.

50 En una realización, las funciones efectoras se pueden eliminar o reducir al utilizar una región constante de un molécula de unión IgG4, que se considera es incapaz de agotar las células objetivo, o hacer variantes Fc, en donde los residuos en la región Fc crítica para las funciones efectoras se mutan utilizando técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,585,097. Por ejemplo, la eliminación o inactivación (a través de mutaciones de punto u otro medio) de un dominio de región constante puede reducir la unión del receptor Fc de la molécula de unión modificada circulante aumentando por lo tanto la localización del tumor. En otros casos puede ser las modificaciones de la región constante consistentes con la invención actual moderen la unión de cumplimiento y así reduzcan la vida útil del suero y la asociación no específica de una citotoxina conjugada. Todavía otras modificaciones de la región constante se pueden utilizar para modificar enlaces de disulfuro o unidades estructurales de oligosacárido que permite la localización mejorada debido a la especificidad aumentada del antígeno o la flexibilidad de la molécula de unión. Más generalmente, aquellos expertos en la técnica se darán cuenta de que las moléculas de unión modificadas como se describe aquí pueden ejercer una serie de efectos delicados que pueden o no ser apreciados fácilmente. Sin embargo el perfil fisiológico resultante, biodisponibilidad y otros efectos bioquímicos de las modificaciones, tal como localización de tumor, biodistribución y vida útil del suero, se puede medir fácilmente y cuantificar utilizando técnicas inmunológicas bien conocidas sin la debida experimentación.

55 En una realización, una molécula de unión de la invención se puede derivar o ligar a otra molécula funcional (por ejemplo, otro péptido o proteína). De acuerdo con lo anterior, una molécula de unión de la invención incluye formas derivadas y modificadas de otra forma de las moléculas de unión anti-GITR descritas aquí, que incluyen moléculas de inmunoadhesión. Por ejemplo, una molécula de unión de la invención se puede ligar funcionalmente (mediante

acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra forma) a una o más de otras entidades moleculares, tal como otra molécula de unión (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente detectable, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación de la molécula de unión con otra molécula (tal como una región núcleo de estreptavidina o una etiqueta de polihistidina).

Un tipo de molécula de unión derivada se produce por entrecruzamiento de dos o más moléculas de unión (del mismo tipo o de diferentes tipos, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los ligadores cruzados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos distintivamente reactivos separados por un separador apropiado (por ejemplo, m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida éster) o homobifuncionales (por ejemplo, disuccinimidil suberato). Dichos ligadores también están disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

Los agentes detectables útiles con los cuales se puede derivar una molécula de unión de la invención incluyen compuestos fluorescentes. Los agentes fluorescentes detectables de ejemplo incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. Una molécula de unión también se puede derivar con enzimas detectables, tal como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, oxidasa de glucosa y similares. Cuando se deriva una molécula de unión con una enzima detectable, se detecta al agregar reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente la peroxidasa de rábano de agente detectable, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobenzidina conduce a un producto de reacción de color, que es detectable. Una molécula de unión también se puede derivar con biotina, y se detecta a través de la medición indirecta de unión de avidina o estreptavidina.

#### IV. Expresión de las moléculas de unión

Una molécula de unión de la invención se puede preparar mediante la expresión recombinante de los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina en una célula anfitriona. Para expresar una molécula de unión recombinantemente, se transfecta una célula anfitriona con uno o más vectores de expresión recombinantes que llevan fragmentos de ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina de la molécula de unión de tal manera que las cadenas ligera y pesada se expresan en la célula anfitriona y, preferiblemente, se secretan en el medio en el que se cultivan las células anfitrionas, de las que se puede recuperar el medio de una molécula de unión. Se utilizan metodologías de ADN recombinante estándar para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo, que incorporan estos genes en el vector de expresión recombinante, e introducen los vectores en células anfitrionas, tal como aquellas descritas en Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. et al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates, (1989) y en Patente Estadounidense No. 4,816,397 por Boss, et al.

Para expresar una molécula de unión de la invención, los ADN que codifican las cadenas pesada y ligera de longitud completa o parcial se pueden insertar en vectores de expresión de tal manera que los genes se ligan operativamente a las secuencias de control transcripcionales y traduccionales. En este contexto, el término "ligado operativamente" significa que un gen de la molécula de unión se liga en un vector de tal manera que las secuencias de control transcripcionales y traduccionales dentro del vector sirven para su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen de la molécula de unión. En una realización, el vector de expresión y las secuencias de control de expresión se seleccionan por ser compatibles con la expresión de la célula anfitriona utilizada. El gen de cadena ligera de la molécula de unión y el gen de cadena pesada de la molécula de unión se puede insertar en un vector separado o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de la molécula de unión se pueden insertar en el vector de expresión mediante métodos estándar (por ejemplo, ligado de los sitios de restricción complementarios en el fragmento y vector de gen de la molécula de unión, o el ligado de extremo romo si no están presentes los sitios de restricción). Antes de la inserción de las secuencias de cadena pesada o ligera de la molécula de unión, el vector de expresión ya puede llevar la región constante de las secuencias de la molécula de unión. Por ejemplo, un método para convertir las secuencias VH y VL en los genes de la molécula de unión de longitud completa para insertarlos en los vectores de expresión que ya codifican las regiones constantes de cadena ligera y las regiones constantes de cadena pesada, respectivamente, de tal manera que el segmento VH se une operativamente a los segmentos CH dentro del vector y el segmento VL se une operativamente al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de la molécula de unión de una célula anfitriona. El gen de cadena de la molécula de unión se puede clonar en el vector de tal manera que el péptido de señal se liga en estructura al terminal amino del gen de cadena de la molécula de unión. El péptido de señal puede ser un péptido de señal de inmunoglobulina o un péptido de señal heterólogo (es decir, un péptido de señal de una proteína de no inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de la molécula de unión, los vectores de expresión recombinantes de la invención llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de la molécula de unión en una

célula anfitriona. El término "secuencia reguladora" incluye promotores, mejoradores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o traducción de los genes de cadena de la molécula de unión. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Se apreciará por aquellos expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión, que incluye la selección de las secuencias reguladoras puede depender de dichos factores como la elección de la célula anfitriona que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión de la célula anfitriona de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen los altos niveles de la expresión de proteína en células de mamífero, tal como promotores y/o mejoradores derivados de citomegalovirus (CMV) (tal como el promotor/mejorador CMV), Virus 40 del Simio (SV40) (tal como el promotor/mejorador SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus principal (AdMLP) y polioma. Para descripción adicional de los elementos reguladores víricos, y las secuencias de los mismos, véase por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,168,062 por Stinski, Patente Estadounidense No. 4,510,245 por Bell et al. y Patente Estadounidense No. 4,968,615 por Schaffner, et al.

Además de la molécula de unión los genes de cadena y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden llevar secuencias adicionales, tal como secuencias que regulan la replicación del vector en las células anfitrionas (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células anfitrionas en los que el vector se ha introducido (véase por ejemplo, Patente Estadounidenses Nos. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, todas por Axel et al.). Por ejemplo, normalmente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos, tal como G418, higromicina o metotrexato, en una célula anfitriona en la que el vector se ha introducido. Los genes de marcador seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células anfitrionas dhfr con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección G418).

Para la expresión de las cadenas ligera y pesada, los vectores de expresión que codifican las cadenas ligera y pesada de la molécula de unión se transfectan en una célula anfitriona mediante técnicas estándar. Las diversas formas del término "transfección" pretenden abarcar una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción del ADN exógeno en una célula anfitriona procariótica o eucariótica, por ejemplo, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección de dextrano DEAE y similares. Es posible expresar una molécula de unión de la invención en cualesquier células anfitrionas procarióticas o eucarióticas, la expresión de las moléculas de unión en células eucarióticas, y más preferiblemente célula anfitrionas de mamífero, es la más preferida debido a que dichas células eucarióticas, y en particular células de mamífero, es más probable que ensamblen células procarióticas y secreten una molécula de unión inmunológicamente activa y apropiadamente plegada.

Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a ampicilina, resistencia a higromicina, resistencia a tetraciclina o resistencia a neomicina) para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, por ejemplo, Itakura et al., Patente Estadounidense 4,704,362).

*E. coli* es un anfitrión procariótico particularmente útil para clonar los polinucleótidos (por ejemplo, secuencias de ADN) de la presente invención. Otros anfitriones microbianos adecuados para uso incluyen bacilos, tal como *Bacillus subtilis*, y otras enterobacteriáceas, tal como *Salmonella*, *Serratia*, y diversas especies de *Pseudomonas*. En estos anfitriones procarióticos, uno también puede hacer vectores de expresión, que contendrá normalmente las secuencias de control de expresión compatibles con la célula anfitriona (por ejemplo, un origen de replicación). Adicionalmente, estará presente cualquier número de una variedad de promotores bien conocidos, tal como el sistema promotor lactosa, un sistema promotor de triptofán (*trp*), un sistema promotor de beta-lactamasa, o un sistema promotor de lambda de fago. Los promotores controlarán normalmente la expresión, opcionalmente con una secuencia operadora, y tienen secuencias del sitio de unión de ribosoma y similares, para iniciar y completar la transcripción y traducción.

Otros microbios, tal como levadura, también son útiles para expresión. *Saccharomyces* es un anfitrión de levadura preferido, con vectores adecuados que tienen secuencias de control de expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen quinasa 3-fosfoglicerato y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de alcohol deshidrogenasa, isocitocromo C, y enzimas responsables del uso de maltosa y galactosa.

Además de los microorganismos, también se puede utilizar cultivo celular de tejido de mamífero para expresar y producir los polipéptidos de la presente invención (por ejemplo, polinucleótidos que codifican las moléculas de unión). Véase Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987). Las células eucarióticas se prefieren actualmente, debido a un número de estirpes de células anfitriona adecuadas capaces de secretar las proteínas heterólogas (por ejemplo, las moléculas de unión intactas) se han desarrollado en la técnica, e incluyen

estirpes celulares CHO, diversas estirpes celulares Cos, células HeLa, estirpes celulares de mieloma, o células B transformadas o hibridomas. Preferiblemente, las células no son humanas. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir las secuencias de control de expresión, tal como un origen de replicación, un promotor, y un mejorador (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), y sitios de información de procesamiento necesario, tal como sitio de unión de ribosoma, sitios de división de ARN, sitios de poliadenilación, y secuencias terminadoras transcripcionales. Las secuencias de control de expresión preferidas son promotores derivados de genes inmunoglobulina, SV40, adenovirus, virus bovino del papiloma, citomegalovirus y similares. Véase Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

Alternativamente, se pueden incorporar secuencias codificantes de molécula de unión en transgenes para introducción dentro del genoma de un animal transgénico y expresión posterior en la leche del animal transgénico (véase, por ejemplo, Deboer et al., US 5,741,957, Rosen, US 5,304,489, y Meade et al., documento US 5,849,992). Los transgenes adecuados incluyen las secuencias codificantes para las cadenas ligera y/o pesada en ligado operable con un promotor y mejorador de un gen específico de glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

Las células anfitrionas de mamífero preferidas para expresar las moléculas de unión recombinantes de la invención incluyen células de Ovario de Hámster Chino (células CHO) (que incluyen células dhfr-CHO, descritas en Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en R.J. Kaufman y P.A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621), células de mieloma NSO, células COS y células SP2. Cuando los vectores de expresión recombinantes que codifican los genes de la molécula de unión se introducen en células anfitrionas de mamífero, las moléculas de unión se producen al cultivar las células anfitrionas durante un periodo suficiente para permitir la expresión de la molécula de unión en las células anfitrionas o, más preferiblemente, la secreción de la molécula de unión en el medio de cultivo en el que las células anfitrionas se cultivan. Las moléculas de unión se pueden recuperar del medio de cultivo utilizando métodos de purificación de proteína estándar.

Los vectores que contienen las secuencias de polinucleótido de interés (por ejemplo, la cadena pesada y ligera de la molécula de unión que codifica las secuencias y las secuencias de control de expresión) se puede transferir en la célula anfitriona mediante métodos bien conocidos, que varían dependiendo del tipo de anfitrión celular. Por ejemplo, se puede utilizar la transfección de cloruro de calcio se utiliza comúnmente para células procarióticas, mientras que el tratamiento de fosfato de calcio, electroporación, lipofección, transfección basada vírica o en biolísticos para otros anfitriones celulares. (Véase generalmente Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989). Otros métodos utilizados para transformar las células de mamífero incluyen el uso de polibreno, fusión de protoplastos, liposomas, electroporación, y microinyección (véase de manera general, Sambrook et al., *supra*). Para la producción de animales transgénicos, los transgenes se pueden microinyectar en oocitos fertilizados, o se pueden incorporar dentro del genoma de mastocitos embrionarios, y el núcleo de dichas células transferidas en oocitos enucleados.

Cuando las cadenas pesada y ligera se clonan en vectores de expresión separados, los vectores se co-transfectan para obtener expresión y ensamble de inmunoglobulinas intactas. Una vez expresado, las moléculas de unión completas, sus dímeros, cadenas pesada y ligera individuales, u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención se puede purificar de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, que incluyen precipitación de sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía de columna, purificación de HPLC, electroforesis de gel y similares (véase de manera general Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Se prefieren las moléculas de unión sustancialmente puras de por lo menos aproximadamente 90 a 95 % de homogeneidad, y se prefiere 98 a 99 % o más homogeneidad, para usos farmacéuticos.

También se pueden utilizar células anfitrionas para producir porciones de las moléculas de unión intactas, tal como fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entenderá que las variaciones en el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula anfitriona con ADN que codifica la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de una molécula de unión de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también se puede utilizar para retirar algo o todo el ADN que codifica una o ambas cadenas ligera y pesada que no es necesaria para unión a GITR. Las moléculas expresadas de dichas moléculas de ADN truncadas también se abarcan por una molécula de unión de la invención. Adicionalmente, las moléculas de unión bifuncionales se pueden producir en las que una cadenas pesada y una cadena ligera son una molécula de unión de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno diferente a GITR mediante entrecruzamiento de una molécula de unión de la invención a una segunda molécula de unión mediante métodos de entrecruzamiento químico estándar.

En vista de lo anterior, se caracteriza aquí el ácido nucleico, vector y las composiciones de célula anfitriona que se pueden utilizar para expresión recombinante de una molécula de unión de la invención. La secuencia de nucleótidos

que codifica la región variable de cadena ligera 6C8 se muestra en la Figura 18 y la SEQ ID NO: 10. El dominio CDR1 del VL abarca nucleótidos 130-162 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO: 14), el dominio CDR2 abarca los nucleótidos 208-228 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO: 15) y el dominio CDR3 abarca nucleótidos 325-351 de la SEQ ID NO: 10 (SEQ ID NO: 16). La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada 6C8 también se muestra en la Figura 18 y la SEQ ID NO: 9. El dominio CDR1 del VH abarca los nucleótidos 133-168 de la SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 11), el dominio CDR2 abarca los nucleótidos 211-258 de la SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 12) y el dominio CDR3 abarca nucleótidos 355-381 de la SEQ ID NO: 9 (SEQ ID NO: 13). La secuencia de nucleótidos que codifica CDR2 del VH puede comprender la SEQ ID NO: 12. La secuencia de nucleótidos que codifica CDR2 del VH puede comprender SEQ ID NO: 65 (CACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTATCAACCATCCCTGAAGAGC). Se apreciará por el experto que las secuencias de nucleótidos que codifican las moléculas de unión relacionadas con 6C8 se pueden derivar de la secuencia de nucleótidos que codifica el 6C8 VL y VH utilizando el código genético y las técnicas de biología molecular estándar.

Se caracterizan aquí moléculas de ácidos nucleicos aisladas que codifican una secuencia de polipéptidos que comprende un CDR 6C8, por ejemplo, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8.

También se caracteriza aquí una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una región variable de cadena ligera de molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, aunque el experto apreciará que debido a la degeneración del código genético, otra molécula de ácidos nucleicos puede codificar la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. La molécula de ácido nucleico puede codificar solo VL o también puede codificar una región constante de cadena ligera de la molécula de unión, ligada operativamente al VL. Esta molécula de ácido nucleico puede estar en un vector de expresión recombinante.

También se caracteriza aquí una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una región variable de cadena pesada de la molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, aunque el experto apreciará que debido a la degeneración del código genético, otra molécula de ácidos nucleicos puede codificar la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. También se caracteriza aquí una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una región variable de cadena pesada de la molécula de unión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66, aunque el experto apreciará que debido a la degeneración del código genético, otra molécula de ácidos nucleicos puede codificar la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66. La molécula de ácido nucleico puede codificar solo el VH o también puede codificar una región constante de cadena pesada, ligada operativamente al VH. Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede comprender una región constante IgG1 o IgG2. Esta molécula de ácido nucleico puede estar en un vector de expresión recombinante.

Se caracterizan aquí vectores de expresión recombinantes que codifican una cadena pesada de molécula de unión y/o una cadena ligera de molécula de unión, por ejemplo: un vector de expresión recombinante que codifica:

a) una cadena ligera de la molécula de unión que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y

b) una cadena pesada de la molécula de unión que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

También se caracteriza aquí un vector de expresión recombinante que codifica:

a) una cadena ligera de la molécula de unión que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2; y

b) una cadena pesada de la molécula de unión que tiene una región variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 66.

También se caracterizan aquí las células anfitrionas en las que uno o más de los vectores de expresión recombinantes se han introducido. Preferiblemente, la célula anfitriona es una célula anfitriona de mamífero.

También se caracteriza aquí un método para sintetizar unas moléculas de unión recombinantes de la invención al cultivar una célula anfitriona en un medio de cultivo adecuado hasta una molécula de unión recombinante de la invención se sintetiza. El método puede comprender adicionalmente aislar la molécula de unión recombinante del medio de cultivo.

## V. Usos de las moléculas de unión de la invención

Dada su capacidad de unirse al GITR, las moléculas de unión de la invención se pueden utilizar para detectar GITR (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como suero o plasma), utilizando un inmunoensayo convencional, tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica de tejido. La molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para detectar hGITR en una muestra biológica que comprende poner en contacto una muestra biológica con la molécula de unión de la invención y detectar la molécula de unión unida a hGITR o la molécula de unión no unida, para detectar por lo tanto hGITR en la muestra biológica. El método se puede realizar in vitro o in vivo. La molécula de unión se marca directamente o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección de la molécula de unión unida o no unida. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes y materiales radioactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos adecuados de complejos del grupo protésico incluyen estreptavidina/ biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y ejemplos del material radioactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$ .

Alternativo con la molécula de unión marcada, se puede evaluar hGITR en fluidos biológicos mediante un inmunoensayo de competencia utilizando los estándares GITR marcados con una sustancia detectable y una molécula de unión anti-hGITR no marcada. En este ensayo, la muestra biológica, los estándares GITR marcados y la molécula de unión anti-hGITR se combinan y se determina la cantidad del estándar GITR marcado unido a la molécula de unión no marcada. La cantidad de hGITR en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de GITR marcado unido a la molécula de unión anti-hGITR.

También se puede utilizar una molécula de unión anti-GITR de la invención para detectar los GITR en muestras de especies diferentes a humanas, en particular GITR de primates (por ejemplo, chimpancés, babuinos, mono tití, macaco y macaco de la india).

En otra realización, la molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para abrogar la supresión de las células efectoras T mediante las células reguladoras T. Se puede evaluar la abrogación de la supresión de las células efectoras T mediante las células reguladoras T, por ejemplo, al medir la capacidad de la molécula de unión para mejorar la función efectora de la célula T en la presencia de las células reguladoras T, por ejemplo, producción de citoquina, (por ejemplo, producción de IL-2) o proliferación celular (por ejemplo, proliferación de célula auxiliar T), por ejemplo, al medir la incorporación de 3H-timidina o mediante análisis FACS. Por ejemplo, la respuesta o actividad de las células efectoras T será baja en la presencia de las células reguladoras T, pero aumentará con la adición de una molécula de unión GITR incluso si están presentes células reguladoras T, es decir, las moléculas de unión GITR abrogan la supresión de las células efectoras T mediante las células reguladoras T.

Las moléculas de unión de la invención también se pueden utilizar para atenuar la degradación de I-KB en las células. La degradación atenuada de I-KB en las células se puede evaluar, por ejemplo, mediante Western blot y cuantificar la cantidad de I-KB luego de tratamiento de las células con la molécula de unión anti-GITR.

Numerosas afecciones patológicas o enfermedades se beneficiarían para mejorar la actividad de las células efectoras T y/o modular por disminución la actividad de las células reguladoras T, por ejemplo, al abrogar la supresión de las células efectoras T mediante las células reguladoras T. Por ejemplo, las células efectoras inmunes no reaccionan efectivamente con células de cáncer. De acuerdo con lo anterior, cuando una célula T efectora mejorada o se desea la respuesta del anticuerpo, los métodos de la invención se pueden utilizar para tratar un sujeto que sufre de dicho trastorno. En una realización dichos métodos comprenden administrar al sujeto una molécula de unión de la invención de tal manera que se aboga la supresión de las células efectoras T mediante las células reguladoras T, que mejora por lo tanto una respuesta inmunológica. Preferiblemente, el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa un GITR con el cual una molécula de unión de la invención reacciona en forma cruzada. Aún adicionalmente, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido GITR (por ejemplo, mediante la administración de GITR o mediante la expresión del transgen GITR). Una molécula de unión de la invención puede estar predispuesta o ser susceptible a la enfermedad. Más aún, una molécula de unión de la invención se puede administrar a un mamífero no humano que expresa una molécula GITR con la cual la molécula de unión reacciona en forma cruzada (por ejemplo, un primate) para propósitos veterinarios o como un modelo de animal de enfermedad humana. Con respecto a lo último, dichos modelos de animal pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica y/o profiláctica de las moléculas de unión de la invención (por ejemplo, prueba de las dosificaciones y/o cursos de tiempo de administración).

Los usos de ejemplo de las moléculas de unión de la invención se discuten adicionalmente adelante:

## Composiciones Inmunoestimuladoras

Como se describe en los ejemplos adjuntos, las moléculas de unión de la invención se pueden utilizar composiciones inmunoestimuladoras (o vacunas), por ejemplo, en combinación con un antígeno, para promover una respuesta inmunológica mejorada a un antígeno de interés, por ejemplo, un antígeno de proteína, en un sujeto. Es decir, las moléculas de unión de la invención pueden servir como adyuvantes para mejorarlas respuestas inmunitarias. Por ejemplo, para estimular un anticuerpo o respuesta inmunológica celular a un antígeno de interés (por ejemplo, para propósitos de vacunación), el antígeno y una molécula de unión de la invención se puede coadministrar (por ejemplo, coadministrar al mismo tiempo en la misma composición o composiciones separadas, o secuencialmente al tiempo) de tal manera que ocurre una respuesta inmunológica mejorada. El antígeno de interés y una molécula de unión se puede formular en una composición farmacéutica única o en composiciones separadas. En una realización, el antígeno de interés y la molécula de unión se administran simultáneamente al sujeto. Alternativamente, en ciertas situaciones puede ser deseable administrar primero el antígeno y luego la molécula de unión o vice versa (por ejemplo, puede ser beneficioso administrar primero el antígeno solo para estimular una respuesta y luego administrar una molécula de unión, sola o junto con un refuerzo de antígeno). En realizaciones preferidas, una molécula de unión G1TR de la invención se administra al momento de cebado con antígeno, es decir, al momento de la primera administración de antígeno. Por ejemplo, día -3, -2, -1, 0, +1, +2, +3. Un día particularmente preferido de administración de una molécula de unión G1TR de la invención es el día -1 antes de la administración de antígeno.

Un antígeno de interés es, por ejemplo, uno capaz de proporcionar protección en el sujeto contra la exposición mediante un agente infeccioso del que se deriva el antígeno, o que es capaz de afectar el crecimiento del tumor y metástasis en una forma que es de beneficio para un sujeto. Los antígenos de interés por lo tanto incluyen aquellos derivados de agentes infecciosos, células de cáncer, y similares, en donde una respuesta inmunológica dirigida contra el antígeno sirve para evitar o tratar la enfermedad provocada por el agente. Dichos antígenos incluyen, pero no se limitan a, proteínas víricas, bacterianas, fúngicas o de parásitos, glucoproteínas, lipoproteínas, glucolípidos, y similares. Los antígenos de interés también incluyen aquellos que proporcionan beneficio a un sujeto que está en riesgo de adquirir o que está diagnosticado como que tiene un tumor y puede incluir, por ejemplo, antígenos relacionados con tumor que expresan exclusivamente mediante o en niveles aumentados mediante células neoplásicas. El sujeto es preferiblemente un mamífero y más preferiblemente, es un humano.

Como se utiliza aquí el término "patógeno" o "agente patogénico" incluye microorganismos que son capaces de infectar o parasitar anfitriones normales (por ejemplo, animales (tal como mamíferos, preferiblemente primates, por ejemplo humanos)). Como se utiliza aquí, el término también incluye agentes oportunistas, por ejemplo, microorganismos que son capaces de infectar o parasitar anfitriones anormales, por ejemplo, anfitriones en los que la flora normal se han suplantado, por ejemplo, como resultado de un régimen de tratamiento, o anfitriones inmunocomprometidos. Como se utiliza aquí el término también incluye microorganismos cuya replicación es indeseada en un sujeto o moléculas tóxicas (por ejemplo, toxinas) producidas por los microorganismos.

Ejemplos no limitantes de antígenos víricos incluyen, pero no se limitan a, la nucleoproteína (NP) de virus influenza y las proteínas Gag de VIH. Otros antígenos heterólogos incluyen, pero no se limitan a, proteína VIH Env o sus partes de componente, gp 120 y gap41, proteína VIH Nef, y las proteínas VIH Pol, transcriptasa inversa y proteasa. Adicionalmente, se pueden utilizar otros antígenos víricos tal como antígenos del virus Ebola (EBOV), tal como, por ejemplo, EBOV NP o glucoproteína (GP), ya sea de longitud completa o GP eliminado en la región mucina de la molécula (Yang Z-Y, et al. (2000) Nat Med 6:886-9, 2000), antígenos de viruela, virus de hepatitis A, B o C, rinovirus humano tal como tipo 2 o tipo 14, virus Herpes simplex, virus de polio tipo 2 o 3, virus de fiebre aftosa (FMDV), virus de la rabia, rotavirus, virus de influenza, virus coxsackie, virus del papiloma humano (HPV), por ejemplo virus del papiloma tipo 16, la proteína E7 del mismo, y fragmentos que contienen la proteína E7 o sus epítopos; y virus de inmunodeficiencia del simio (SIV). Los antígenos de interés no necesitan estar limitados por antígenos de origen vírico. Se incluyen antígenos parasíticos, tal como, por ejemplo, antígenos de malaria, como lo son los antígenos fúngicos, antígenos bacterianos y antígenos neoplásicos que también se pueden utilizar en relación con las composiciones y métodos descritos. Ejemplos no limitantes de antígenos bacterianos incluyen: antígenos Bordetella pertussis (por ejemplo, antígenos de proteína P69 y hemaglutinina filamentososa (FHA)), *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, y *E. coli* tal como la subunidad de la toxina B lábil al calor *E. coli* (LT-B), antígenos *E. coli* K88, y antígenos enterotoxigénicos *E. coli*. Otros ejemplos de antígenos incluyen antígenos glutatona S-transferasa *Schistosoma mansoni* P28 (antígenos P28) y antígenos de tremátodos, micoplasmas, lombrices, tenias *Chlamydia trachomatis*, y parásitos de malaria, por ejemplo, parásitos del género *Plasmodium* o *babesia*, por ejemplo *Plasmodium falciparum*, y péptidos que codifican los epítopos inmunogénicos de los antígenos mencionados anteriormente.

Una infección, enfermedad o trastorno que se puede tratar o evitar por la administración de una vacuna de la invención incluye cualquier infección, enfermedad o trastorno en donde una respuesta inmunológica de anfitrión

actúa para evitar la infección, enfermedad o trastorno. Las enfermedades, trastornos, o infección que se pueden tratar o evitar mediante la administración de las composiciones inmunoestimuladoras de la invención incluyen, pero no se limitan a, cualquier infección, enfermedad o trastorno provocado por o relacionado con un hongo, parásito, virus, o bacteria, enfermedades, trastornos o infecciones provocadas por o relacionadas con diversos agentes utilizados en bioterrorismo, listeriosis, virus de Ebola, SARS, viruela, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, y hepatitis E, enfermedades y trastornos provocados por rinovirus humano, VIH (por ejemplo, VIH-1 y VIH-2), y SIDA, Herpes, polio, virus de fiebre aftosa, rabia, enfermedades o trastornos provocados por o relacionados con: rotavirus, influenza, virus coxsackie, virus del papiloma humano, SIV, malaria, cáncer, por ejemplo, tumores, virus de herpes humano, citomegalovirus (esp. Humano), virus de Epstein-Barr, Virus de Varicela Zoster, virus de hepatitis, tal como virus de hepatitis B, virus de hepatitis A, virus de hepatitis C, paramixovirus: Virus sincitial respiratorio, virus de parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano (por ejemplo HPV6, 11, 16, 18, y similares), flavivirus (por ejemplo Virus de la Fiebre Amarilla, Virus del Dengue, virus de encefalitis transmitida por garrapatas, Virus de Encefalitis Japonesa), o virus de influenza, por ejemplo, influenza A (por ejemplo, subtipos, hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N)), influenza B, e influenza C, y enfermedades o trastornos provocados por o relacionados con infección mediante organismos bacterianos, que incluyen bacterias gram-positivas y gram-negativas. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, *Neisseria* spp, que incluye *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis*, *Streptococcus* spp, que incluye *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mutans*; *Haemophilus* spp, que incluye *H. influenzae* tipo B, *H. influenzae* no tipificable, *H. ducreyi*; *Moraxella* spp, que incluye *M. catarrhalis*, también conocido como *Branhamella catarrhalis*; *Bordetella* spp, que incluye *B. pertussis*, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium* spp., que incluye *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella* spp, que incluye *L. pneumophila*; *Escherichia* spp, que incluye *E. coli* enterotóxico, *E. coli* enterohemorrágico, *E. coli* enteropatogénico; *Vibrio* spp, que incluye *V. cholera*, *Shigella* spp, que incluye *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia* spp, que incluye *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Campylobacter* spp, que incluye *C. jejuni* y *C. coli*; *Salmonella* spp, que incluye *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria* spp., que incluye *L. monocitogenes*; *Helicobacter* spp, que incluye *H. pylori*; *Pseudomonas* spp, que incluye *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., que incluye *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus* spp., que incluye *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium* spp., que incluye *C. tetani*, *C. botulinum*, *C. difficile*; *Bacillus* spp., que incluye *B. anthracis*; *Corynebacterium* spp., que incluye *C. diphtheriae*; *Borrelia* spp., que incluye *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. yersonii*, *B. hermsii*; *Ehrlichia* spp., que incluye *E. equi* y el agente del Ehrlichiosis Granulocítica Humana; *Rickettsia* spp, que incluye *R. rickettsii*; *Chlamydia* spp., que incluye *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*; *Leptospira* spp., que incluye *L. interrogans*; *Treponema* spp., que incluye *T. pallidum*, *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*. Las bacterias preferidas incluyen, pero no se limitan a, *Listeria*, micobacterias, micobacterias (por ejemplo, tuberculosis), Anthrax, *Salmonella* y *Listeria monocitogenes*, *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, tremátodos, micoplasmas, gusanos, lombrices, *Chlamydia trachomatis*, y parásitos de malaria.

En otra realización, las células T se pueden retirar de un paciente, y se ponen en contacto in vitro con una molécula de unión anti-GITR, opcionalmente con una señal de activación (por ejemplo, antígeno más APC o un anticuerpo policlonal) y se reintroducen en el paciente.

Las células T reguladoras cumplen una función importante en el mantenimiento de la auto-tolerancia inmunológica al suprimir las respuestas inmunitarias contra enfermedades auto-inmunitarias y cáncer. De acuerdo con lo anterior, en una realización, abrogar la supresión de las células efectoras T por las células reguladoras T sería beneficioso para mejorar una respuesta inmunológica en cáncer. Por lo tanto, las moléculas de unión de la invención se pueden utilizar en el tratamiento de cáncer, para inhibir el crecimiento del tumor o metástasis. Las moléculas de unión se pueden administrar sistémicamente o localmente al sitio del tumor.

En una realización, la modulación de la función de GITR puede ser útil en la inducción de inmunidad de tumor, es decir, para el tratamiento de un sujeto con enfermedad neoplásica o cáncer. En una realización, una molécula de unión de la invención reduce el tamaño del tumor, inhibe el crecimiento del tumor y/o prolonga el tiempo de supervivencia de un sujeto que tiene un tumor. Se puede administrar una molécula de unión GITR a un paciente que tiene células neoplásicas (por ejemplo, sarcoma, melanoma, linfoma, leucemia, neuroblastoma, carcinoma) para superar la tolerancia específica del tumor en el sujeto.

El término "antígeno relacionado con tumor," como se utiliza aquí, significa un antígeno que afecta el crecimiento del tumor o metástasis en un organismo anfitrión. El antígeno relacionado con tumor puede ser un antígeno expresado por la célula de tumor, o puede ser un antígeno que se expresa por una célula de no tumor, pero que cuando así se expresa, promueve el crecimiento o metástasis de las células neoplásicas. Los tipos de antígenos neoplásicos y antígenos relacionados con tumor incluyen cualquier antígeno neoplásico conocido o por lo tanto desconocido, que incluye, sin limitación, el antígeno bcr/abl en leucemia, los antígenos HPVE6 y E7 del virus oncogénico asociado con cáncer cervical, los antígenos MAGE1 y MZ2-E en o asociados con melanoma, y los antígenos MVC-1 y HER-2 en o asociados con cáncer de mama.

Como se utiliza aquí, el término "enfermedad neoplásica" se caracteriza por crecimiento de tumor maligno o en estados de enfermedad caracterizados por células hiperproliferativas benignas e hiperplásicas. El significado médico común del término "neoplasia" se refiere un "nuevo crecimiento celular" que resulta como una pérdida de respuesta a los controles de crecimiento normales, por ejemplo, crecimiento de células neoplásicas.

5 Como se utiliza aquí, los términos "hiperproliferativo", "hiperplásico", "maligno" y "neoplásico" se utilizan intercambiamente, y se refieren a aquellas células en un estado o condición normal caracterizado por proliferación rápida o neoplasia. Los términos significan que incluyen todos los tipos de crecimiento hiperproliferativo, crecimiento hiperplásico, crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células malignamente transformadas, tejidos, u órganos, independiente del tipo histopatológico o etapa de invasividad. Una  
10 "hiperplasia" se refiere a células que experimentan un índice de crecimiento anormalmente alto. Sin embargo, como se utiliza aquí, los términos neoplasia e hiperplasia se pueden utilizar intercambiamente, como su contexto revelará, con referencia de manera general a células que experimentan índices de crecimiento celular anormales. Las neoplasias e hiperplasias incluyen "tumores," que pueden ser benignos, premalignos o malignos.

15 Los términos "neoplasia," "hiperplasia," y "tumor" comúnmente se denominan frecuentemente como "cáncer," que es un nombre general para más de 100 enfermedades que se caracterizan por crecimiento anormal de células, incontrolado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a: cáncer de mama; colon; células no microcítica de pulmón, cabeza y cuello; colorectal; pulmón; próstata; ovario; renal; melanoma; y gastrointestinal (por ejemplo, pancreático y de estómago); y sarcoma osteogénico.

20 En una realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste de: cáncer pancreático, melanomas, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer bronquial, cáncer colorectal, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de vejiga urinaria, cáncer del sistema nervioso central o cerebro, cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer esofágico, cáncer cervical, cáncer uterino o endometrial, cáncer de la cavidad oral o faringe, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer testicular, cáncer del tracto biliar, cáncer de apéndice o de intestino delgado, cáncer de glándula salivar, cáncer de glándula tiroide, cáncer de glándula suprarrenal, osteosarcoma,  
25 condrosarcoma, cáncer de tejidos hematológicos.

De acuerdo con lo anterior, la molécula de unión de la invención se puede utilizar en un método para tratar enfermedad neoplásica o cáncer en un sujeto, preferiblemente un humano, u otro animal al administrar a dicho sujeto o animal una cantidad efectiva de la molécula de unión de la invención. Un experto en la técnica es capaz, mediante experimentación de rutina, de determinar qué cantidad efectiva de polipéptido sería para el propósito de  
30 tratar enfermedad neoplásica o cáncer. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de una molécula de unión de la invención puede variar de acuerdo con factores tal como la etapa de la enfermedad (por ejemplo, etapa I versus etapa IV), edad, sexo, complicaciones médicas (por ejemplo, afecciones o enfermedades inmunosupresoras) y peso del sujeto, y la capacidad de la molécula de unión de provocar una respuesta deseada en el sujeto. El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica y/o profiláctica óptima. Por  
35 ejemplo, se pueden administrar diariamente diversas dosis divididas, o la dosis se puede reducir proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. De manera general, sin embargo, se espera que una dosificación efectiva esté en el rango de aproximadamente 0.05 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal por día y más preferiblemente de aproximadamente 0.5 a 10, miligramos por kilogramo de peso corporal por día.

#### Métodos para Mejorar las Respuestas Inmunitarias

40 Las moléculas de unión del sujeto también se pueden utilizar en métodos para mejorar las respuestas inmunitarias. La regulación por aumento de las respuestas inmunitarias puede estar en la forma de mejorar una respuesta inmunológica existente o provocar una respuesta inmunológica inicial. Por ejemplo, mejorar una respuesta inmunológica mediante la modulación de GITR puede ser útil en casos de infección vírica. Cuando las moléculas de unión anti-GITR actúan para mejorar las respuestas inmunitarias, estas serían terapéuticamente útiles en situaciones  
45 donde es más rápida o completa la depuración de agentes patogénicos, por ejemplo, serían beneficiosas bacterias y virus. De acuerdo con lo anterior, las moléculas de unión anti-GITR de la invención se pueden utilizar terapéuticamente, solas o en combinación con un antígeno o un agente inmunoestimulador adicional, para tratar un sujeto que sufre de una enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad infecciosa o cáncer, por ejemplo, aquellos mencionados supra.

50 También se pueden utilizar profilácticamente moléculas de unión anti-GITR en vacunas contra diversos patógenos. La inmunidad contra un patógeno, por ejemplo, un virus, se puede inducir mediante vacunación con una proteína vírica junto con una molécula de unión GITR (como se describió alternativamente). Alternativamente, un vector de expresión que codifica los genes para un antígeno patogénico y una molécula de unión GITR, por ejemplo, un vector de expresión del virus vaccinia construido por ingeniería para expresar un ácido nucleico que codifica una proteína  
55 vírica y un ácido nucleico que codifica una molécula de unión GITR, se puede utilizar para vacunación. Los

patógenos para los que las vacunas pueden ser útiles incluyen, por ejemplo, hepatitis B, hepatitis C, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus, VIH-1, VIH-2, influenza, tuberculosis, malaria y esquistosomiasis.

Las moléculas de unión de la invención se pueden utilizar adicionalmente en terapias con base en la molécula de unión que implican administrar las moléculas de unión de la invención a un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un humano, paciente para tratar, detectar, y/o evitar una o más de las enfermedades, trastornos, o afecciones descritas. Los compuestos terapéuticos de la invención pueden incluir, pero no se limitan a, las moléculas de unión de la invención (que incluyen análogos y derivados de los mismos como se describe aquí) y las moléculas de unión anti-idiopticas como se describe aquí. Se puede utilizar una molécula de unión de la invención para tratar, diagnosticar, inhibir o evitar enfermedades, trastornos o afecciones asociadas con la actividad aberrante de GTR, que incluyen, pero no se limitan a, una cualquiera o más de las enfermedades, trastornos, o afecciones descritas aquí (por ejemplo, las moléculas de unión de la invención se pueden proporcionar en composiciones farmacéuticamente aceptables como se conoce en la técnica o como se describe aquí.

Una molécula de unión de esta invención se puede utilizar ventajosamente en combinación con otras moléculas de unión monoclonales o quiméricas, o con linfoquinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tal como, por ejemplo, IL-2, IL-3 y IL-7), por ejemplo, que sirven para aumentar el número o actividad de células efectoras que interactúan con una molécula de unión.

Una molécula de unión de la invención se puede administrar sola o en combinación con otros tipos de tratamientos (por ejemplo, terapia de radiación, quimioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia y agentes anti-tumor, antibióticos, terapia dirigida contra un agente patogénico (tal como por ejemplo un agente inmunoterapéutico o quimioterapéutico contra un patógeno vírico o un antígeno bacteriano) y agentes inmunoestimuladores. una molécula de unión de la invención también se puede administrar en combinación con un antígeno en el que se desea una respuesta inmunológica mejorada, por ejemplo, una vacuna o un antígeno de un agente patogénico (o una forma atenuada de un virus o bacteria) o un antígeno de un tumor como se describió alternativamente. En una realización, una molécula de unión de la invención se administra sola o en terapia de combinación a un sujeto con una infección. En otra realización, una molécula de unión de la invención se administra sola o en combinación a un sujeto con una infección vírica crónica. En todavía otra realización, una molécula de unión de la invención se administra sola o en combinación a un sujeto con cáncer.

De manera general, se prefiere la administración de las moléculas de unión derivadas de una especie que es de la misma especie que aquella del paciente. Sin embargo, en una realización preferida, las moléculas de unión humanas, derivados, análogos, o ácidos nucleicos, se administran a un paciente humano para terapia o profilaxis.

## VI. Composiciones Farmacéuticas

Una molécula de unión de la invención se puede incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Normalmente, la composición farmacéutica comprende una molécula de unión de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza aquí la frase "portador farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes que retrasan la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que los medios convencionales o el agente sean incompatibles con el compuesto activo, se contempla el uso de las composiciones. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

Se formula una composición farmacéutica de la invención que sea compatible con su ruta de administración pretendida. Ejemplos de las rutas de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosal, y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol o otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tal como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tal como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tal como ácido etilendiaminatetraacético; reguladores tal como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tal como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o múltiples frascos de vidrio o plástico para dosis.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica,

agua bacterioestática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina regulada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición puede ser estéril y debe ser fluida al grado que exista fácil inyectabilidad. Puede ser estable bajo condiciones de fabricación y almacenamiento y se puede conservar contra la acción contaminante de los microorganismos tal como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensoactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tal como manitol, sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar aproximadamente al incluir en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Se pueden preparar soluciones inyectables estériles al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización filtrada. De manera general, se preparan dispersiones al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado por vacío y secado por congelamiento que produce un polvo de ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada previamente estéril del mismo.

Las composiciones orales de manera general incluyen un diluyente inerte o un portador comestible. Estos se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimir en tabletas. Para el propósito de administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y se utiliza en la forma de comprimidos, grageas, o cápsulas. También se pueden preparar composiciones orales utilizando un portador fluido para uso como un enjuague bucal, en donde el compuesto en el portador fluido se aplica oralmente y se enjuaga y expectora o traga. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles, y/o materiales adyuvantes se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, grageas y similares pueden contener solo los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un ligador tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel, o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un aglutinante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente endulzante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, metil salicilato, o sabor a naranja.

Para administración por inhalación, los compuestos se suministran en la forma de un rociador en aerosol de contenedor o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser mediante medios transmucosales o transdérmicos. Para administración transmucosal o transdérmica, los penetrantes apropiados para la barrera que se va a permear se utilizan en la formulación. Dichos penetrantes se conocen de manera general en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede llevar a cabo a través del uso de rociadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, salvias, geles, o cremas como se conoce de manera general en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar en la forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tal como manteca de cacao y otros glicéricos) o enemas de retención para suministro rectal.

En una realización, una molécula de unión de la invención se prepara con portadores que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tal como vinil acetato de etileno, polianhidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Métodos para la preparación de dichas formulaciones deben ser evidentes para aquellos expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas también se pueden utilizar como portadores farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,522,811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de dosificación unitaria como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención se dictan por y son directamente dependientes de las únicas características del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos con dicho compuesto activo para el tratamiento de los individuos.

La toxicidad y eficacia terapéutica de dichos compuestos se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar el LD50 (la dosis letal de 50 % de la población) y el ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Los compuestos que exhiben grandes índices terapéuticos se prefieren. Aunque los compuestos que exhiben efectos colaterales tóxicos se pueden utilizar, se debe tener cuidado en diseñar un sistema de suministro que dirige dichos compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial para las células no infectadas y, reduciendo por lo tanto los efectos colaterales.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios de animal se pueden utilizar en la formulación de un rango de dosificación para uso en humanos. La dosificación de dichos compuestos se relaciona preferiblemente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen en ED50 con poca o sin toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en el método de la invención, se puede estimar la dosis terapéuticamente efectiva inicialmente de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos de animal para lograr un rango de concentración de plasma circulante que incluye el IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición media máxima de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar más exactamente las dosis útiles en los humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto desempeño.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un contenedor, empaque, o dispensador junto con instrucciones para administración.

#### VII. Administración de las moléculas de unión de la invención

Las moléculas de unión de la invención se ponen en contacto con las células de un sujeto en una forma biológicamente compatible in vitro o in vivo. "Forma biológicamente compatible" significa una forma del agente que se administra en la que cualesquier efectos tóxicos se ven compensados por los efectos terapéuticos de la molécula de unión.

En una realización, las composiciones del sujeto se administran a un sujeto. La administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones terapéuticas de la presente invención se define como una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante periodo necesarios para lograr el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de molécula de unión puede variar de acuerdo con factores tal como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la molécula de unión para provocar una respuesta deseada en el individuo. Se puede ajustar los regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar diariamente diversas dosis divididas o la dosis se puede reducir proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una "cantidad terapéuticamente efectiva" o una "cantidad profilácticamente efectiva" de una molécula de unión de la invención. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante periodos necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva de la molécula de unión puede variar de acuerdo con factores tal como el estado de la enfermedad, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad de la molécula de unión para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la que cualesquier efectos perjudiciales o tóxicos de la molécula de unión se ven compensados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, en dosificaciones y durante periodos necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, debido a que se utiliza la dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa temprana de enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo único, se pueden administrar

diversas dosis divididas durante el tiempo o la dosis se puede reducir proporcionalmente o se aumenta como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación como se utiliza aquí se refiere a unidades físicamente discretas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitarias de la invención se dictan mediante y directamente dependiente en (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular que se va a lograr, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos de dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un rango no limitante de ejemplo para una cantidad profilácticamente y terapéuticamente efectiva de una molécula de unión de la invención es, por ejemplo, de aproximadamente 0.1-25 mg/kg, de aproximadamente 1.0-10 mg/kg, de aproximadamente 0.5-2.5 mg/kg, de aproximadamente 5-25 mg/kg, de aproximadamente 1-400 mg/kg. Cabe notar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y severidad de la afección que se va a aliviar. Se entiende adicionalmente que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar durante el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación establecidos aquí son solo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance o práctica de la composición reivindicada. Los rangos no limitantes, adicionales para una cantidad profilácticamente o terapéuticamente efectiva de una molécula de unión de la invención es de aproximadamente 0.0001 a 100 mg/kg, y de aproximadamente 0.01 a 5 mg/kg (por ejemplo, 0.02 mg/kg, 0.25 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, etc.), del sujeto de peso corporal. Por ejemplo, las dosificaciones pueden ser 1 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del rango de 1-10 mg/kg, preferiblemente por lo menos 1 mg/kg. Las dosis intermedias en los rangos anteriores también pretenden estar dentro del alcance de la invención.

Los sujetos se pueden administrar de dichas dosis diarias, en días alternativos, semanalmente o de acuerdo con cualquier otro esquema determinado mediante análisis empírico. Un tratamiento de ejemplo supone la administración en múltiples dosificaciones durante un periodo prolongado, por ejemplo, de por lo menos seis meses. Los regímenes de tratamiento de ejemplo adicionales suponen la administración una vez por cada dos meses o una vez un mes o una vez cada 3 a 6 meses. Los esquemas de dosificación de ejemplo incluyen 1-10 mg/kg o 15 mg/kg en días consecutivos, 30 mg/kg en días alternos o 60 mg/kg semanalmente.

Las moléculas de unión de la invención se pueden administrar en múltiples ocasiones. Los intervalos entre las dosificaciones únicas pueden ser, por ejemplo, diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. Los intervalos n también pueden ser irregulares como se indica al medir los niveles de sangre de la molécula de unión en el paciente.

Las moléculas de unión de la invención opcionalmente se pueden administrar en combinación con otros agentes que son efectivos en tratar el trastorno o afección en necesidad de tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico). Los agentes adicionales preferidos son aquellas que se reconocen en la técnica y se administran en forma estándar para un trastorno particular.

La molécula de unión se puede administrar en una forma conveniente tal como mediante inyección (subcutánea, intravenosa, etc.), administración oral, inhalación, aplicación transdérmica, o administración rectal. Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo se puede cubrir en un material para proteger el compuesto de la acción de las enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Por ejemplo, para administrar el agente por otro diferente de administración parenteral, puede ser deseable para cubrir, o co-administrar el agente con, un material para evitar su inactivación.

Una molécula de unión de la presente invención se puede administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo de administración preferida es inyección intravenosa o infusión. Como se apreciará por el experto, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo se puede preparar con un portador que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tal como vinil acetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones se patentan o de manera general se conocen por aquellos expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

En ciertas realizaciones, una molécula de unión de la invención se puede administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también se puede encerrar en una cápsula de gelatina de cubierta dura o blanda, comprimida en tabletas, o incorporadas directamente en la dieta del sujeto. Para la administración terapéutica oral, los compuestos se pueden incorporar con excipientes y se utilizan en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, grageas, cápsulas, 5 elíxires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Para administrar un compuesto de la invención por otra administración parenteral diferente, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o se co-administra el compuesto con, un material para evitar su inactivación.

Las moléculas de unión se pueden co-administrar con inhibidores de enzima o en un portador apropiado tal como liposomas. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y solución reguladora acuosa. El adyuvante se utiliza en su sentido más amplio e incluye cualquier compuesto estimulante inmune tal como interferón. Los adyuvantes contemplados aquí incluyen resorcinoles, tensoactivos no iónicos tal como oleil éter de polioxitileno y polietileno éter n-hexadecilo. Los inhibidores de enzima incluyen inhibidor de tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DEEP) y trasilol. Las liposomas incluyen emulsiones agua en aceite en agua así como también liposomas convencionales (Sterna et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27).

El compuesto activo también se puede administrar parenteralmente o intraperitonealmente. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el crecimiento de los microorganismos.

Cuando el compuesto activo se protege en forma adecuada, como se describió alternativamente, la molécula de unión se puede administrar oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable.

Los compuestos complementarios activos también se pueden incorporar en las composiciones. En ciertas realizaciones, una molécula de unión de la invención se coformula con y/o se coadministra con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, una molécula de unión anti-GITR de la invención se puede coformular y/o coadministrar con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otros objetivos por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citoquinas o que unen las moléculas de superficie celular. Dichas terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones inferiores de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

La presente invención abarca adicionalmente las moléculas de unión conjugados con un agente diagnóstico o terapéutico. Una molécula de unión se puede utilizar diagnósticamente para, por ejemplo, supervisar el desarrollo o evolución de un tumor como parte de un procedimiento de prueba clínica para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar al acoplar el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, metales de emisión de positrones utilizando diversas tomografías de emisión de positrones, y iones de metal paramagnético no radioactivo. La sustancia detectable se puede acoplar o conjugar directamente con la molécula de unión o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un ligador conocido en la técnica) utilizando técnicas conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 4,741,900 para iones de metal que se pueden conjugar con las moléculas de unión para uso como diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa de alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos del grupo protésico adecuado incluyen estreptavidina/biotina y avidina/ biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y ejemplos de material radioactivo adecuado  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99\text{Tc}}$ .

Adicionalmente, se puede conjugar una molécula de unión a una unidad estructural terapéutica tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocidal, un agente terapéutico, un ión de metal radioactivo, por ejemplo, emisores alfa tal como, por ejemplo,  $^{213}\text{Bi}$ , toxinas biológicas, profármacos, péptidos, proteínas, enzimas, virus, lípidos, modificadores de la respuesta biológica, agentes farmacéuticos, ligandos inmunológicamente activos (por ejemplo, limfoquinas u otros anticuerpos). En otra realización, una molécula de unión de la invención se puede conjugar con una molécula que reduce la vascularización de los tumores. En otras realizaciones, las composiciones descritas pueden comprender las moléculas de unión de la invención acopladas a fármacos o profármacos. Todavía otras realizaciones de la presente invención comprenden el uso de las moléculas de unión de la invención conjugadas con biotoxinas específicas o sus fragmentos citotóxicos tal como ricina, gelonina, exotoxina pseudomonas o toxina difteria. La selección de la molécula de unión conjugada o no conjugada para uso dependerá en el tipo y

etapa de cáncer, uso de tratamiento adjunto (por ejemplo, quimioterapia o radiación externa) y afección del paciente. Se apreciará que un experto en la técnica puede hacer fácilmente dicha selección en vista de las enseñanzas aquí.

Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Ejemplos incluyen paclitaxol, citochalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6- tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucilo tioepa, melfalan, carnustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomannitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cisplatina de cis-cliclorodiamina platino (II) (DDP)), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramina (AMC)), y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

### EJEMPLOS

Los siguientes materiales y métodos se utilizan en ciertos Ejemplos:

#### Métodos

##### Cultivo de estirpes celulares T

Se producen estirpes celulares diferenciadas de células preparadas de sangre de cordón umbilical humano o células T vírgenes CD4+CD45RA+ de sangre periférica mediante una variedad de métodos, que incluyen citometría de flujo y separaciones de gránulo magnético. La pureza de las poblaciones de partida es >95 %. Las células luego se estimulan por los anticuerpos CD3 y CD28 en RPMI 1640 con 10 % de FCS y 1 % de suero AB humano con mezclas definidas de citoquinas y neutralizan los anticuerpos con citoquinas para producir los tipos de células diferenciadas. Se producen células Th1 mediante cultivo con IL12 (62 U/ml) y anti-IL4 (0.2 mg/ml); se producen células Th2 mediante cultivo en IL4 (145 U/ml) y anti-IL12 (10 ug/ml) y anti-IFN $\gamma$  (10 ug/ml); y se producen células T reguladoras mediante cultivo en TGF $\beta$  (32U/ml), IL9 (42 U/ml), anti-IL4 (10 ug/ml) y anti-IL12 (10 ug/ml) y anti-IFN $\gamma$  (10 ug/ml). (Observe: no se utiliza anti-IL12 en todos los experimentos). Todos los cultivos se complementan con IL2 (65 U/ml) y IL15 (4500 U/ml). Las células se dividen en platos de cultivo más grandes como se garantiza por división celular.

#### EJEMPLO 1: Aislamiento y Purificación de 6C8

El anticuerpo 6C8 es un IgG2b, kappa. La purificación de este anticuerpo revela la presencia de una cadena pesada doble (Figura 1). Esto se puede deber a la glucosilación o contaminación alternativa con otro Ab. La cromatografía de exclusión de tamaño muestra la presencia de un pico (Figura 2).

El anticuerpo 6C8 se purifica como sigue:

1. Lavado con 20 ml de Proteína G (Pharincia HR 10/30) con 5CV de dPBS
2. Se carga 1L (serie 1) o 2 L (serie 2) del sobrenadante hGTR (6C8)
3. Se lava con 10 CV de PBS
4. Se eluye con 100 mM Citrato, pH 2.8 directamente en 1 M Tris (20-25 % v: v)
5. Se depura con 100 mM Citrato, pH 2.8, 0.3 M NaCl

#### EJEMPLO 2: Caracterización de 6C8

El anticuerpo 6C8 se une a las células transfectadas GTR-L-M. (Figura 3) y los PBL activados (Figura 4). La curva de saturación de anti-GTR marcado con biotina en linfocitos activados sugiere una buena afinidad relativa (Figura 5).

El anticuerpo 6C8 es co-estimulador en linfocitos T activados con el anti-CD3 subóptimo (Figura 6). Este anticuerpo no co-estimula el mismo nivel como CD28, pero es comparable con el anti-GTR comercial (R&D).

El anticuerpo 6C8 no induce apoptosis en los linfocitos activados (Figura 7). Los linfocitos se activan con PHA durante 3 días antes de la adición del anticuerpo. Comparado con YTH 655 (CD2 anti-humano conocido por inducir apoptosis en los linfocitos activados) 6C8 no aumenta la apoptosis de los linfocitos T activados.

5 El anticuerpo 6C8 no bloquea una reacción de linfocito mezclado principal (MLR) (Figura 8). Se utiliza TRX1 (CD4 anti-humano) como un control positivo para el MLR.

**EJEMPLO 3: El Anticuerpo 6C8 Abroga la Supresión de las Células Efectoras T Inducidas por las Células Reguladoras T**

10 El anticuerpo 6C8 es capaz de bloquear la supresión inducida por las células reguladoras T (Figura 9). Las células CD4+/CD25+ se agregan a las células CD4+/CD25- en diversas relaciones. Las células se estimulan con anti-CD3 y anti-CD28 unido a placa. En una relación de 1:1 las células CD4+/CD25+ son capaces de abrogar la proliferación de las células CD4+/CD25-. La adición de 6C8 con los cultivos es capaz de bloquear la supresión en una forma dependiente de dosis.

15 Cuando las células T se estimulan a través de anti-CD3 solo (sin co-estimulación con anti-CD28) no se presenta supresión observada con la adición de células CD4+/CD25+ en las células CD4+/CD25-, de hecho, el anticuerpo anti-GITR es ligeramente co-estimulador bajo estas condiciones (Figura 10).

**EJEMPLO 4: El Anticuerpo 6C8 Modula la Señalización por medio de NF-κB**

La activación de células T por medio de CD3 o CD3 y CD28 resulta en la activación de las rutas de señalización I-κB, como se evalúa por fosforilación I-κB (Figura 12 y 14) y degradación posterior (Figura 11 y 13).

20 Como se presenta en la Figura 11, bajo condiciones de activación parcial, el anti-GITR tiene un efecto significativo en la señalización I-κB, como se evalúa por degradación dependiente de tiempo de I-κB. En la presencia de la molécula de unión GITR, la degradación se atenúa significativamente, en todos los puntos de tiempo analizados. Los cambios anteriores se correlacionan amablemente con la reducción de la fosforilación de I-κB (Figura 12).

25 De forma interesante la magnitud de la respuesta es mayor para TH2 y Treg vs. TH1. Adicionalmente la expresión de GITR parece ser mayor en células TH1, comparado con células TH2 y Treg, (como se evalúa por MCF (fluorescencia de canal medio)) en experimentos paralelos. Las células T se activan completamente por medio de entrecruzamiento de CD3 y CD28 que pierde su respuesta al anti-GITR, sin embargo retiene completamente la activación de I-κB por medio de TNF-α.

**EJEMPLO 5: El anticuerpo 6C8 Mejora las Respuestas inmunitarias**

30 El modelo de tumor de melanoma B16 es un modelo de melanoma agresivo que se ha utilizado para estudiar la función de las células reguladoras T en cáncer. El tratamiento de ratones con un anticuerpo anti-CD25 agotado o anti-CTLA-4 ha mostrado resultados promisorios en este modelo. En ambos casos, los tratamientos son capaces de retrasar el inicio del tumor y el tamaño del tumor. Debido a que el GITR se expresa en células CD25+ y puede estar implicado en abrogar la supresión de las células reguladoras T, se tratan ratones que llevan tumor B16 con la molécula de unión anti-GITR para determinar si se presenta un efecto en el inicio del tumor o tamaño del tumor. El tratamiento con la molécula de unión anti-GITR un día después que los ratones se inyectan con tumor resulta en un inicio retrasado y tamaño de tumor (Figura 17). Adicionalmente, se presentan aún ratones en el grupo GITR tratado que están libres de tumor al final del estudio.

40 Todos los animales se inyectan con  $10^4$  células de melanoma B16 en su flanco derecho en el día 0. Los grupos GITR recibieron 2 miligramos, 1 miligramo, 0.5, miligramos, o 0.2 miligramos de la molécula de unión anti-GITR en el Día 1. Los tumores medibles son visibles partiendo en el Día 16.

**EJEMPLO 6: Suministro Simultáneo de Anti-GITR y Antígeno Resulta en un Efecto Adyuvante**

45 El efecto adyuvante de un anticuerpo anti-mGITR en la respuesta humoral para ovalbúmina (Ova) o hemaglutinina (HA) se investiga adicionalmente. Los ratones se tratan sin anticuerpo, YAML (control de isotipo), o 2F8 (anti-mGITR de rata) en los días -1, 0, y 1 at 0.4 mg/día. Para evaluar la importancia del receptor Fc comprometida en el mecanismo de acción de la molécula de unión, se trata un grupo de animales adicional con 6 mg/día de 2F8 F(ab')<sub>2</sub> en los días -1, 0 y 1. Esta dosis se selecciona con base en la vida útil corta de F(ab')<sub>2</sub> comparado con el anticuerpo completo. Los ratones se inmunizan con Ova (100mg) o HA (10 mg) en el día 0. Los ratones tratados Ova se exponen con 100 mg de Ova en el día 14 y luego se desangran en los días 21 y 28 para obtener muestras de suero

para ensayos ELISA. Los ratones tratados con HA se exponen con 5 mg de HA en el día 14 y también se desangran en los días 21 y 28.

5 Las concentraciones de suero de 2F8 y 2F8 F(ab')<sub>2</sub> se supervisan para evaluar los perfiles farmacocinéticos de las moléculas de unión. En el día 1, son comparables los niveles de suero de la molécula de unión en ratones tratados con 2F8 o los fragmentos 2F8 F(ab')<sub>2</sub>. La molécula de unión se detecta en los ratones tratados con 2F8 hasta el día 9, mientras que los ratones tratados con el fragmento 2F8 F(ab')<sub>2</sub> tienen la molécula de unión detectable solo hasta el día 3, a pesar de una dosis mayor de 15X.

10 Los resultados demuestran que en el brazo HA del estudio, los ratones tratados con 2F8 tienen un aumento de 4 y 5 veces en los anticuerpos anti-HA comparado con animales tratados sin anticuerpo y un aumento de 18 y 20 veces en los anticuerpos anti-HA comparado con ratones tratados con YAML en los días 21 y 28, respectivamente (Figura 19). El título anti-HA observado con el anticuerpo anti-mGITR como un adyuvante es comparable con el título observado cuando se administra HA con adyuvante de Freund Incompleto (IFA). Esto sugiere que la respuesta observada con el anticuerpo anti-mGITR es comparable con uno de los adyuvantes más potentes frecuentemente utilizados en los estudios inmunológicos.

15 En el brazo Ova de estudio, los ratones tratados con 2F8 tienen un aumento de 13 y 6 veces en los anticuerpos anti-Ova comparado con los animales tratados sin anticuerpo y un aumento de 17 y 8 veces en anticuerpos anti-Ova comparado con ratones tratados con YAML en el día 21 y día 28, respectivamente (Figura 20). El efecto del anticuerpo 2F8 en la respuesta a Ova es comparable con la respuesta observada a HA. Los ratones tratados con 2F8 F(ab')<sub>2</sub> tienen un aumento de 4 y 3 veces en anticuerpos Anti-Ova comparado con animales tratados sin anticuerpo y un aumento de 6 y 5 veces en los anticuerpos anti-Ova comparado con ratones tratados con YAML en el día 21 y día 28, respectivamente (Figura 20). La dosis de F(ab')<sub>2</sub> y los diferentes perfiles farmacocinéticos comparados con el anticuerpo completo pueden explicar la respuesta reducida anti-Ova cuando se compara con los ratones tratados con 2F8.

25 Juntos, estos datos demuestran que el efecto del anticuerpo 2F8 en la respuesta humoral a antígeno es predominantemente atribuible a la porción F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo y que el receptor Fc comprometido no se puede requerir para el efecto adyuvante del anticuerpo anti-mGITR.

**EJEMPLO 7: Preparación de una Molécula de unión Anti-GITR Quimérica**

30 La región de cadena ligera variable 6C8 se injerta a una región constante de cadena ligera humana utilizando técnicas de biología molecular convencionales. Se utiliza la región constante de cadena ligera IgG1. La secuencia de aminoácidos de la molécula de unión GITR de cadena ligera quimérica completa se muestra adelante:

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYSASY  
 RYSGVPPDRFTGSGSGTDFTLTINNVSIEDLAEIFCQQYNTDPLTFGAGTKLEIKR  
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
 VTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
 (SEQ ID NO:22).

35 La cadena pesada variable 6C8 también se injerta a una región constante de cadena pesada humana utilizando técnicas de biología molecular convencionales. Se utiliza la región constante de cadena pesada IgG1. La secuencia de aminoácidos de la molécula de unión GITR de cadena pesada quimérica completa se muestra adelante (también denominado como "Gly"):

QVTLKESGPGILKPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIW  
 WDDDKYYNPSLKSQTLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADAATYYCARTRRYFPFAY  
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK  
 VEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM  
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:23).

- 5 En razón a que la secuencia de aminoácidos NX(S/T) es una secuencia consensus putativa para un sitio de glucosilación puede afectar la producción de la molécula de unión, y la región constante IgG1 de la cadena pesada 6C8 tiene la secuencia NST, una segunda versión de la región constante de cadena pesada se prepara para sustituir conservativamente una glutamina por una asparagina en el residuo de aminoácido 299 (en negrilla y resaltado anteriormente) de la SEQ ID NO: 23. De acuerdo con lo anterior, una segunda región constante humana se injerta a la región variable de cadena pesada 6C8. La secuencia de aminoácidos de la molécula de unión GITR de cadena pesada quimérica completa se muestra adelante (también denominado "Agly"):

QVTLKESGPGILKPSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIW  
 WDDDKYYNPSLKSQTLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADAATYYCARTRRYFPFAY  
 WGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS  
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK  
 VEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH  
 DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
 CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM  
 HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:24).

10 **EJEMPLO 8: Preparación de las Formas Humanizadas de la Molécula de Unión 6C8 Anti-GITR**

- 15 La estrategia basada en homología CDR descrita en Hwang et al. (2005) Methods (36) 35-42 se utiliza para humanizar 6C8. Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y pesada se ejecutaron utilizando una base de datos públicamente disponible, y los resultados indican que 6C8 tiene una estructura canónica de cadena pesada 3-1 y una estructura canónica de cadena ligera 2-1-1. A partir de esto, todos los genes V de cadena kapa de línea germinal con una estructura canónica 2-1-1 en la base de datos IMGT se comparan con la secuencia del anticuerpo 6C8. Lo mismo se hace para la cadena pesada en donde todos los genes V de cadena pesada de línea germinal 3-1 se comparan con la secuencia de aminoácidos 6C8. Solo se comparan las secuencias CDR y se seleccionan las estructuras principales con base en las secuencias de línea germinal que tienen la mayoría de coincidencias en los CDR. (Ver alineaciones adelante).

- 20 Para la cadena ligera, la secuencia 3-15\*01 tiene 14 coincidencias en los CDR y se selecciona. Debido a que CDR 3 finaliza con leucina y treonina, se utiliza la secuencia del segmento de gen Jk4 J.

Genes V de Cadena Ligera con IMGT de Estructura Canónica 2-1-1

## ES 2 432 091 T3

Nombre del gen	CDR1	CDR2	CDR3 ID
IGKV1-5	RASQSISSWLA.....	DASSLES.....	QQYNSYS.. 11
IGKV1-6	RASQGIRNDLG.....	AASSLSQ.....	LQDYNYP.. 9
IGKV1-9	RASQGISSYLA.....	AASTLQS.....	QQLNSYP.. 11
IGKV1-12	RASQGISSWLA.....	AASSLQS.....	QQANSFP.. 11
IGKV1-16	RASQGISSWLA.....	AASSLQS.....	QQYNSYP.. 12
IGKV1D-16	RARQGISSWLA.....	AASSLQS.....	QQYNSYP.. 11
IGKV1-17	RASQGIRNDLG.....	AASSLQS.....	LQHNSYP.. 9
IGKV1-27	RASQGISNYLA.....	AASTLQS.....	QKYNSAP.. 11
IGKV1-33	QASQDISNYLN.....	DASNLET.....	QQYDNLN.. 9
IGKV1-39	RASQSISSYLN.....	AASSLQS.....	QQSYSTP.. 9
IGKV1D-43	WASQGISSYLA.....	YASSLQS.....	QQYYSTP.. 11
IGKV3-11	RASQSVSSYLA.....	DASNRAT.....	QQRSNWP.. 11
IGKV3D-11	RASQGVSSYLA.....	DASNRAT.....	QQRSNWH.. 10
IGKV3-15	RASQSVSSNLA.....	GASTRAT.....	QQYNNWP.. 14
6C8	KASQNVGTNVA.....	SASYRYS.....	QQYNTDP

5 Todos los genes V de cadena kapa de cadena ligera de línea germinal con una estructura canónica 2-1-1 en la base de datos IMGT se comparan con laces de anticuerpos 6C8. Lo mismo se hace para la cadena pesada en donde todos los genes V de cadena pesada de línea germinal 3-1 se comparan con la secuencia de aminoácidos 6C8.

Utilizando esta metodología se hace una versión de la cadena ligera:  
 EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQNVGTNVAWYQQKPGQAPRLLIYSASYRYS  
 GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLSQSEDFAVYYCQQYNTDPLTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 44) (los CDR están en cursiva)

10 Para la cadena pesada, la secuencia 2-05\*01 tiene 17 coincidencias. Sin embargo, las secuencias alrededor del CDR 3 son diferentes de 6C8 (YYCAR vs. YYCAHR). En razón a que se ha mostrado que el CDR 3 es el CDR más importante para reconocimiento, es importante mantener esta área tan perfectamente coincidente como sea posible. La secuencia 2-70\*01 tiene 16 coincidencias en los CDR y se seleccionan las secuencias derechas antes que el CDR 3 coincida perfectamente con los 6C8 y 2-70\*01.

15 Para el segmento de gen J de la cadena pesada, el JH4 tiene la mayoría de coincidencias y por lo tanto se selecciona. Las secuencias de aminoácidos luego se traducen inversas y se obtienen los cebadores que corresponden a la secuencia de nucleótidos deseada de IDT (Coralville, IA).

Genes V de Cadena Pesada con IMGT de Estructuras Canónicas 3-1

## ES 2 432 091 T3

Nombre del Gen	CDR1	CDR2	IDs
IGHV2-5	TSGVGVG.....	LIYWND DKRYSPSLKS	17
IGHV2-26	NARMGVS.....	HIFSNDEKSYSTSLKS	12
IGHV2-70	TSGM CVS.....	LIDWDDDKYYSTSLKT	16
IGHV4-30-2	SGGYSWS.....	YIYHSGSTYYNPSLKS	10
IGHV4-30-4	SGDYYS.....	YIYSGSTYYNPSLKS	9
IGHV4-31	SGGYYS.....	YIYSGSTYYNPSLKS	9
IGHV4-39	SSSYWG.....	SIYSGSTYYNPSLKS	10
IGHV4-61	SGSYYS.....	YIYSGSTNYNPSLKS	8
6C8	TSGMGVG.....	HIWWDDDKYYNPSLKS	

Utilizando esta metodología se hace una versión de la cadena pesada:

**QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIWW**  
**DDDKYYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARTRRYFPFAYW**  
**GQGT LVTVSS (SEQ ID NO:53) (también denominado como "N")**

- 5 En razón a que la secuencia de aminoácidos NX(S/T) es una secuencia consensus putativa para un sitio de glucosilación que puede afectar la producción de la molécula de unión, y CDR2 de la cadena pesada 6C8 tiene la secuencia NPS, se prepara una segunda versión de la cadena pesada preparada para sustituir conservadoramente una glutamina para una asparagina en el residuo de aminoácido 62 (en negrilla y subrayado anteriormente) de la SEQ ID NO: 53. De acuerdo con lo anterior, se hace una segunda versión de cadena pesada:

**QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIWW**  
**DDDKYYQPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARTRRYFPFAYW**  
**GQGT LVTVSS (SEQ ID NO:54) (también denominado como "Q")**

- 10 Se realiza una alineación de secuencia múltiple CLUSTAL W (1.82) (utilizando una matriz de clasificación Blosum con una penalidad de espacio de 10) de la región variable de cadena ligera 6C8 y también la secuencia de cadena ligera de línea germinal 3-15\*01. Los resultados se presentan adelante:

```

6C8          DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQOKPGQSPKALIYSASYRYSGVPD
3-15*01     EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQOKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA
             :*****  :*. * :*.:*:*:*. *.:*:*****:*: * :*. * * :*: *

6C8          ÑFTGSGSGTDFTLTINNVSSEDLAEYFCQQYNTDPLTFGAGTKLEIK
3-15*01     RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWP-----
             **:*****:*****.:*: * *:*****. *
    
```

- 15 Con base en los análisis CLUSTAL W, se identifican diversos residuos de aminoácido en la estructura principal humana para sustitución potencial con los residuos de aminoácido que corresponden a los residuos de estructura principal 6C8 en la cadena ligera humanizada 6C8. Específicamente, la E en la posición 1, la P en la posición 8, la A en la posición 9, la T en la posición 10, la L en la posición 11, la V en la posición 13, la P en la posición 15, la E en la posición 17, la A en la posición 19, la T en la posición 20, la L en la posición 21, la S en la posición 22, la A en la

posición 43, la R en la posición 45, la L en la posición 46, la I en la posición 58, la A en la posición 60, la S en la posición 63, la E en la posición 70, la S en la posición 76, la S en la posición 77, la L en la posición 78, la Q en la posición 79, la F en la posición 83, la V en la posición 85, la Y en la posición 87, la G en la posición 100, y la V en la posición 104.

- 5 De forma similar, una alineación de secuencia múltiple CLUSTAL W (1.82) (utilizando una matriz de clasificación Blosum con una penalidad de espacio de 10) de la región variable de cadena pesada 6C8 y también se realizan las proteínas de cadena pesada de línea germinal con una secuencia de aminoácidos 2-70\*01. Los resultados se presentan adelante:

```

6C8          QVTLKESGPGILKPSQTLSLTCSFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWDDDKY
2-70*01     QVTLRESGPALVKPTQLTLTCTFSGFSLSTSGMCSVWIRQPPGKALEWLALIDWDDDKY
          ****:****.:**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:* *.*****.*.*.***** * *****

6C8          YNPSLKSQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADAATYYCARTRRYFPFAYWGQGLVTVSS
2-70*01     YSTSLKTRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDATYYCARI-----
          *.***.:*****:*.*.*.*.*.*.*:*:*:*:*:*:*:*
    
```

- 10 Con base en los análisis CLUSTAL W, se identifican diversos residuos de aminoácido en la estructura principal humana para sustitución potencial con los residuos de aminoácido que corresponden a los residuos de estructura principal 6C8 en la cadena pesada humanizada 6C8. Específicamente, la R en la posición 5, la A en la posición 10, la L en la posición 11, la V en la posición 12, la T en la posición 15, la T en la posición 19, la T en la posición 23, la P en la posición 43, la A en la posición 46, la R en la posición 68, la K en la posición 77, la V en la posición 81, la T en la posición 83, la M en la posición 84, la N en la posición 86, la M en la posición 87, la P en la posición 89, la V en la posición 90, y/o la T en la posición 92.

Se hacen cuatro moléculas de unión 6C8 de longitud completa humanizadas que tienen las siguientes combinaciones de cadena pesada y ligera humanizada:

- 20 (HuN6C8-Gly) de versión de longitud completa 1 (HuN6C8-Gly) -cadena ligera (L) 6C8 humanizada/cadena Pesada Humanizada con la N en CDR2 ("N") y que comprende una región constante que tiene un N ("Gly")
- (HuN6C8-Agly) de versión de longitud completa 2 – cadena Ligera (L) 6C8 (Hu) humanizada /cadena Pesada Humanizada con el N en CDR2 ("N") y que comprende una región constante que tiene un A ("Agly")
- (HuQ6C8-Gly) de versión de longitud completa 3 – cadena Ligera (L) humanizada 6C8 (Hu) /cadena Pesada Humanizada con la Q en CDR2 ("Q") y que comprende una región constante que tiene un N ("Gly")
- 25 (HuQ6C8-Agly) de versión de longitud completa 4 – cadena Ligera (L) 6C8 humanizada (Hu) /cadena Pesada Humanizada con la Q en CDR2 ("Q") y que comprende una región constante que tiene un A ("Agly")

La secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada IgG1 glucosilada que se utiliza para hacer las moléculas de unión de longitud completa se muestra adelante:

```

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPGK (SEQ ID NO:55).
    
```

- 30 La secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena pesada IgG1 glucosilada que se utiliza para hacer las moléculas de unión de longitud completa se muestra adelante:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT  
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD

GVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSL  
SLSPGK (SEQ ID NO:56).

La secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena ligera IgG1 que se utiliza para hacer las moléculas de unión de longitud completa se muestra adelante:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
SVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  
(SEQ ID NO:57).

- 5 La secuencia de aminoácidos completa de la cadena ligera 6C8 humanizada se muestra adelante:

EIVMTQSPATLSVSPGERATLCKASQNVGTNVAWYQQKPGQAPRLLIYSASYR  
YSGIPARFSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQYNTDPLTFGGGTKVEIKRTV  
AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT  
EQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ  
ID NO:58).

Se puede incluir opcionalmente la secuencia líder METQSQVFVYMLLWLSGVDG (SEQ ID NO: 59).

Las secuencias de aminoácidos completas de las versiones de cadena pesada humanizada 6C8 HuN6C8-Agly, HuQ6C8-Gly, y HuQ6C8-Agly se muestran adelante:

- 10 HuN6C8-Gly

QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVGVIRQPPGKALEWLAHIW  
WDDDKYYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLTMNMDPVDATYYCARTRRYFPFA  
YWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK  
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:60);

HuN6C8-Agly

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIW  
WDDDKYYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARTRRYFFFA  
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN

SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK  
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:61);

HuQ6C8-Gly

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIW  
WDDDKYYQPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARTRRYFFFA  
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK  
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:62); y

HuQ6C8-Agly

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVWIRQPPGKALEWLAHIW  
WDDDKYYQPSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARTRRYFFFA  
YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN  
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK  
VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE  
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK  
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS  
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM  
HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:63).

5

La secuencia líder MDRLTFSFLLLVIPAYVLS (SEQ ID NO: 64) puede incluir opcionalmente.

Equivalentes

10 Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando no más que experimentación de rutina, se describen aquí muchos equivalentes para las realizaciones específicas de la invención. Dichos equivalentes pretenden estar abarcados por las siguientes reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SMITH, L. MARY SZYMANSKA, GRAZYNA PONATH, PAUL ROSENZWEIG, MICHAEL

<120> MOLÉCULAS DE UNIÓN G1TR Y USOS DE LAS MISMAS

<130> TLN-029PC

<140>

<141>

<150> 60/665,322

<151> 2005-03-25

5 <150> 60/687,265

<151> 2005-06-03

<160> 68

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

10 <211> 138

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

```

Met Asp Arg Leu Thr Phe Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1          5          10          15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys
 20        25        30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35        40        45
Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50        55        60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
 65        70        75        80
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg
 85        90        95
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ala Ala
 100       105       110
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp
 115      120      125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130      135

```

15 <210> 2

<211> 127

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 3

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly  
 1 5 10

10 <210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 4

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 9

20 <212> PRT



ES 2 432 091 T3

Gln Gln Tyr Asn Thr Asp Pro Leu Thr  
1 5

<210> 9

<211> 414

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 9

```
atggacagac ttacattctc attcctgctg ctgattgtcc ctgcatatgt cttgtcccaa 60
gttactctaa aagagtctgg ccctgggata ttgaagccct cacagaccct cagtctgact 120
tgttctttct ctgggttttc actgagcact tctggtatgg gtgtaggctg gattcgtcag 180
ccttcaggga agggctctga gtggctggcg cacatttggg gggatgatga taagtactat 240
```

```
aatccatccc tgaagagcca gtcacaatc tccaaggata cctccagaaa ccaggtattc 300
ctcaagatca ccagtgtgga cactgcagat gctgccactt actactgtgc tcgaactagg 360
aggtacttcc cctttgctta ctggggccaa gggacactag tcacagtctc ctca 414
```

<210> 10

<211> 381

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 10

```
atggagacac agtctcaggt cttgtatcac atgttctgtg ggttctctgg tgttgatgga 60
gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
gtcacctgca aggccagtc gaatgtgggt actaatgtag cctggatca acagaaacca 180
gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 240
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacaa tgtgactct 300
gaagacttgg cagagtattt ctgtcaacaa tataacaccg atccgctcac gttcggagct 360
gggaccaagc tgaaatcaa a 381
```

<210> 11

15 <211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

20 <400> 11

gggttttcac tgagcacttc tggtatgggt gtaggc 36

<210> 12

<211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

5 <400> 12

cacatttggg gggatgatga taagtactat aatccatccc tgaagagc 48

<210> 13

<211> 27

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

<400> 13

actaggaggt acttcccctt tgcttac 27

15 <210> 14

<211> 33

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

<400> 14

aaggccagtc agaatgtggg tactaatgta gcc 33

<210> 15

<211> 21

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

<400> 15

tcggcatcct accggtacag t 21

<210> 16

<211> 27

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

<400> 16

caacaatata acaccgatcc gctcag 27

10 <210> 17

<211> 1214

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

```
gtctacaccc cctcctcaca cgcacttcac ctgggtcggg attctcaggt catgaacggt 60
cccagocacc tccgggcagg ggggtgagg acggggacgg ggcgtgtcca actggctgtg 120
ggctcttgaa acccgagcat ggcacagcac ggggcgatgg gcgcgtttcg ggccctgtgc 180
ggcctggcgc tgctgtgccc gctcagcctg ggtcagcggc ccaccggggg tcccgggtgc 240
ggcctgggac gctcctgctc tgggacggga acggacgcgc gctgctgccc gggtcacacg 300
acgcgctgct gccgcgatta cccgggcgag gactgctgtt ccgagtggga ctgcatgtgt 360
gtccagcctg aattcoactg cggagaccct tgctgcacga cctgccggca ccacccttgt 420
ccccaggcc aggggttaca gtcccagggg aaattcagtt ttggcttcca gtgtatcgac 480
tgtgctcgg ggacctctc cgggggccac gaaggccact gcaaaccttg gacagactgc 540
accagttcg ggtttctcac tgtgttcctt gggacaaga cccacaacgc tgtgtgctgc 600
ccagggtccc cgcgggcaga gccgcttggg tggctgaccg togtcctcct ggccgtggcc 660
gcctgcgtcc tcctcctgac ctccggccag ctggactgc acatctggca gctgaggagt 720
cagtgcattg ggccccgaga gaccagctg ctgctggagg tgccgcgctc gaccgaagac 780
gccagaagct gccagttccc cgaggaaagc cggggcagc gatcggcaga ggagaagggg 840
cggctgggag acctgtgggt gtgagcctgg ccgtcctccg gggccaccga ccgcagccag 900
```

```
ccccccccca ggagctcccc aggcgcgagg ggctctgctg tetgctctgg gccgggccc 960
gctccccctg cagcagaagt ggggtgcagga aggtggcagt gaccagcgc ctggaccatg 1020
cagttcggcg gccgcggctg gccctgcag gaggagaga gagacacagt catggcccc 1080
ttcctccctt gctggccctg atgggtggg gtcttaggac gggaggctgt gtcctgggt 1140
gtgcagtgcc cagcacggga cccggctgca ggggacctc aataaacact tgtccagtga 1200
aaaaaaaaaa aaaa 1214
```

15

<210> 18

<211> 241

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 18

ES 2 432 091 T3

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

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido Sintético

<400> 19

His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Gln Pro Ser Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

ES 2 432 091 T3

<210> 20

<211> 105

<212> PRT

<213> Mus musculus

5 <400> 20

```

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

<210> 21

<211> 334

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400> 21

```

Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Cys Gly
 1          5          10          15
Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
 20          25          30
Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
 35          40          45
Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr Met
    
```



ES 2 432 091 T3

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

<210> 23

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de cadena pesada humana/ratón sintética

<400> 23

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



ES 2 432 091 T3

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

Lys

<210> 24

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cadena pesada química completa humana/ratón sintético

<400> 24

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp



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

<210> 26

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

<210> 27

<211> 95

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

ES 2 432 091 T3

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

<210> 28

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 28

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

<210> 29

<211> 95

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

ES 2 432 091 T3

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

<210> 30

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 30

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

<210> 31

<211> 95

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

<210> 32

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 32

```

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

<210> 33

<211> 95

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 33

```

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

<210> 34

<211> 95

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

ES 2 432 091 T3

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

<210> 35

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 35

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

<210> 36

<211> 95

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

ES 2 432 091 T3

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

<210> 37

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 37

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

<210> 38

<211> 95

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

ES 2 432 091 T3

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

<210> 39

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 39

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

<210> 40

10 <211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

ES 2 432 091 T3

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

<210> 41

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 41

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

<210> 42

<211> 95

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

ES 2 432 091 T3

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

<210> 43

<211> 95

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 43

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

<210> 44

<211> 107

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 44

ES 2 432 091 T3

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

<210> 45

<211> 96

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 45

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

<210> 46

<211> 100

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

ES 2 432 091 T3

```

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

```

<210> 47

<211> 100

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 47

```

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

```

<210> 48

<211> 99

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

ES 2 432 091 T3

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

<210> 49

<211> 99

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 49

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

<210> 50

<211> 99

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

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

<210> 51

<211> 99

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 51

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

<210> 52

<211> 99

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

ES 2 432 091 T3

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

<210> 53

<211> 119

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 53

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

10 <210> 54

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de proteína sintética

# ES 2 432 091 T3

<400> 54

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

<210> 55

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 55

ES 2 432 091 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
 20 25 30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60  
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80  
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95  
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 56

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 56

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1           5           10           15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
           20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
           35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50           55           60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65           70           75
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
           85           90           95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
           100          105          110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115          120          125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130          135          140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145          150          155          160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
           165          170          175
Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
           180          185          190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195          200          205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210          215          220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225          230          235          240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
           245          250          255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260          265          270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275          280          285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290          295          300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305          310          315          320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
           325          330

```

5

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 57

```

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1                               5                10                15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
                20                25                30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
          35                40                45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50                55                60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

65                70                75                80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          85                90                95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          100                105
    
```

<210> 58

10 <211> 214

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de proteína sintética

15 <400> 58

ES 2 432 091 T3

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

<210> 59

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Secuencia líder a aminoácido sintético

<400> 59

Met Glu Thr Gln Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Gly Val Asp Gly  
 20

10 <210> 60

<211> 449

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de proteína sintética

&lt;400&gt; 60

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

ES 2 432 091 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys

<210> 61

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de proteína sintética

ES 2 432 091 T3

<400> 61

Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser  
 20 25 30  
 Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu  
 35 40 45  
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser  
 50 55 60  
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val  
 65 70 75 80  
 Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
 85 90 95  
 Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
 115 120 125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
 130 135 140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145 150 155 160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
 165 170 175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
 180 185 190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
 195 200 205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
 210 215 220  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
 245 250 255  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
 260 265 270  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 275 280 285  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val  
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 305 310 315 320  
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 325 330 335  
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 340 345 350  
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 355 360 365  
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 370 375 380  
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 385 390 395 400  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 405 410 415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 420 425 430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 435 440 445

Lys

<210> 62

<211> 449

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 62

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



<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 63

```

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

```

5



<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético

<400> 65

cacatttggt gggatgatga taagtactat caaccatccc tgaagagcca 50

5 <210> 66

<211> 138

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 66

```

Met Asp Arg Leu Thr Phe Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr
 1           5           10           15
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys
 20           25           30
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu
 35           40           45
Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys
 50           55           60
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
 65           70           75           80
Gln Pro Ser Leu Lys Ser Gln Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg
 85           90           95
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Ala Ala
 100          105          110
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Arg Arg Tyr Phe Pro Phe Ala Tyr Trp
 115          120          125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130          135
    
```

10

<210> 67

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 67

```

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

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

<210> 68

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Construcción de proteína sintética

<400> 68

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

10

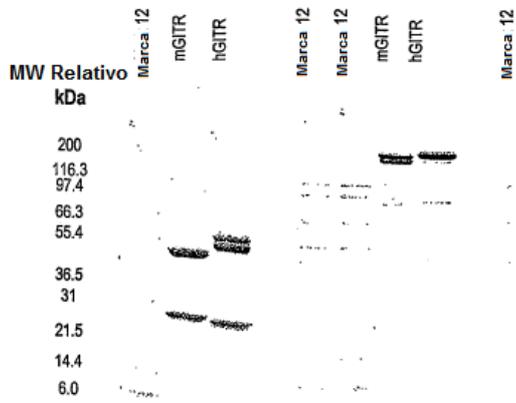
## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal aislado que comprende una cadena pesada y una cadena ligera, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, cuyo fragmento de unión de anticuerpo o antígeno se une específicamente a un receptor relacionado con la familia TNFR inducido por glucocorticoide (GITR), en donde dicho fragmento de unión a antígeno o anticuerpo del mismo comprende:
- 10 (a) las secuencias de aminoácidos de la región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR) en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO. 66, en donde dichas las secuencias de aminoácidos CDR de cadena pesada comprenden los residuos de aminoácido 45-56 de la SEQ ID NO: 1, los residuos de aminoácido 119-127 de la SEQ ID NO: 1, y uno de los residuos de aminoácido 71-86 de la SEQ ID NO: 1 y los residuos de aminoácido 71-86 de la SEQ ID NO: 66; y
- (b) las secuencias de aminoácidos CDR de cadena ligera en la SEQ ID NO: 2, en donde dichas las secuencias de aminoácidos CDR de cadena ligera comprenden los residuos de aminoácido 44-54 de la SEQ ID NO: 2, los residuos de aminoácido 70-76 de la SEQ ID NO: 2, y los residuos de aminoácido 109-117 de la SEQ ID NO: 2.
- 15 2. Un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende (a) la región variable de cadena pesada se establece en los residuos de aminoácido 20-138 de la SEQ ID NO: 1 o los residuos de aminoácido 20-138 de la SEQ ID NO: 66 y
- (b) la región variable de cadena ligera se establece en los residuos de aminoácido 21-127 de la SEQ ID NO: 2.
- 20 3. Un anticuerpo monoclonal aislado, o fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 que se une específicamente al receptor relacionado con la familia TNFR inducido por glucocorticoides (GITR) en células T humanas y células dendríticas humanas y tiene una constante de unión (Kd) de  $1 \times 10^{-9}$  o menos.
4. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 1 o 3, en donde el fragmento de unión de anticuerpo o antígeno comprende las regiones de estructura principal de cadena ligera y pesada humana.
- 25 5. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno of la reivindicación 1 o 3, en donde el fragmento de unión de anticuerpo o antígeno comprende una región constante de cadena pesada IgG2b.
6. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 1 o 2, en donde el fragmento de unión de anticuerpo o antígeno se une al GITR humano.
7. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 1, 2, o 3, en donde el fragmento de unión de anticuerpo o antígeno modula la actividad del GITR humano.
- 30 8. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 1, 2, o 3, en donde el fragmento de unión de anticuerpo o antígeno es un fragmento de unión de anticuerpo quimérico o antígeno.
9. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 1 o 3, en donde el fragmento de unión de anticuerpo o antígeno es un fragmento de unión de anticuerpo humanizado o antígeno.
- 35 10. Una composición que comprende el fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 1, 2, o 3 y un portador farmacéuticamente aceptable.
11. La composición de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente por lo menos un agente terapéutico adicional para uso en tratar cáncer en un sujeto.
12. La composición de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente por lo menos un agente terapéutico adicional para uso en tratar una infección vírica en un sujeto.
- 40 13. La composición de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente por lo menos un antígeno neoplásico para uso en tratar cáncer en un sujeto.

14. La composición de la reivindicación 10, que comprende adicionalmente por lo menos un antígeno de un agente patogénico para uso en tratar una infección vírica en un sujeto.
- 5 15. El fragmento de unión a antígeno de la reivindicación 1, 2, o 3, que es un fragmento de unión a antígeno seleccionado del grupo que consiste de un fragmento Fab, un fragmento (Fab'), un fragmento (Fab')<sub>2</sub>, una molécula scFv, un fragmento Fd, un fragmento Fv, y un fragmento de anticuerpo de dominio único (DAb).
16. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno, de la reivindicación 1, 2, o 3 que comprende una región constante de cadena pesada IgG1 humana.
- 10 17. Un anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en donde el fragmento de unión de anticuerpo o antígeno se une específicamente al receptor relacionado con la familia TNFR inducido por glucocorticoides (GITR) en el mismo epítipo como, y compite para unión a GITR con, el fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 1, 2, o 3.
18. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 1, 2 o 3, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende la secuencia amino de cadena ligera quimérica establecida en la SEQ ID NO: 22.
- 15 19. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 1 o 3, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada quimérica se establece en una de la SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24.
20. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 1 o 3, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera humanizada establecida en la SEQ ID NO: 44.
- 20 21. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 1 o 3, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada humanizada se establece en una de la SEQ ID NO: 53 o SEQ ID NO: 54.
- 25 22. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 1 o 3, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende la secuencia de aminoácidos de cadena ligera humanizada establecida en la SEQ ID NO: 58.
23. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 1 o 3, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada humanizada seleccionada del grupo de las secuencias de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, y SEQ ID NO: 63.
- 30 24. Un anticuerpo monoclonal aislado, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el fragmento de unión de anticuerpo o antígeno comprende las regiones de estructura principal de cadena ligera y pesada humana, excepto que uno o más residuos de aminoácido de estructura principal humana se retromuta en un residuo de aminoácidos de estructura principal de murino correspondiente.
- 35 25. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 24, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno tiene una constante de unión (Kd) de  $1 \times 10^{-9}$  o menos.
26. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de la reivindicación 4, en donde las regiones de estructura principal de cadena ligera y pesada son las regiones de estructura principal de cadena pesada y ligera de línea germinal.
- 40 27. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno como se reivindica en cualquier reivindicación precedente, para uso en un método para inducir o mejorar una respuesta inmunológica en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto un anticuerpo de unión a GITR, o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
28. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 27, en donde el sujeto comprende una fuente de antígeno a la que está dirigida la respuesta inmunológica.

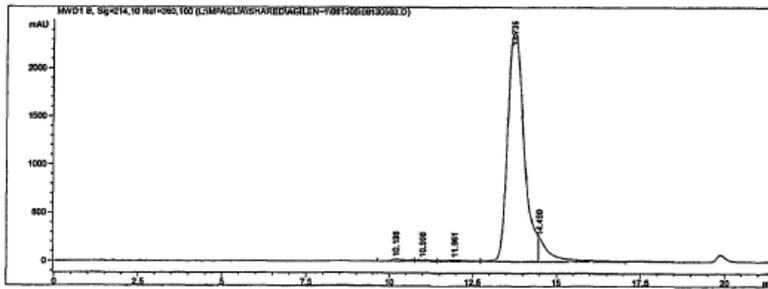
29. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 28, en donde la fuente de antígeno comprende un tumor o un microorganismo infeccioso.
- 5 30. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 27, 28, o 29, en donde la respuesta inmunológica comprende una respuesta inmunológica humoral.
- 10 31. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 27, 28, 29, o 30, en donde la unión del anticuerpo de unión a GITR o el fragmento de unión a antígeno para una célula T resulta una abrogación de la supresión de una célula efectora T mediante una célula reguladora T.
32. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 27, 28, 29, o 30, en donde el anticuerpo de unión a GITR o el fragmento de unión a antígeno mejora la proliferación de una célula efectora T.
- 15 33. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 27, 28, 29, o 30, en donde la unión del anticuerpo de unión a GITR o el fragmento de unión a antígeno para una célula T resulta en la modulación de la degradación de I- $\kappa$ B en la célula T.
34. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 27, 28, 29, o 30, en donde la unión del anticuerpo de unión a GITR o el fragmento de unión a antígeno para una célula T resulta en la modulación de la actividad GITR en la célula T.
- 20 35. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 27, 28, 29, o 30, en donde la unión del fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de unión a GITR para un receptor de célula T que modula la célula T que induce la señalización en una célula efectora T.
- 25 36. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, para uso en un método para inducir o mejorar una respuesta inmunológica a un antígeno en un sujeto, el método comprende administrar al sujeto el anticuerpo de unión a GITR, o el fragmento de unión a antígeno del mismo, y un antígeno.
- 30 37. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 36, en donde el antígeno es un antígeno neoplásico o un antígeno de microorganismo infeccioso.
38. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 36, en donde la unión del anticuerpo de unión a GITR o el fragmento de unión a antígeno para una célula T resulta una abrogación de la supresión de una célula efectora T mediante una célula reguladora T.
- 35 39. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 36, en donde la administración del anticuerpo de unión a GITR o el fragmento de unión a antígeno mejora la proliferación de una célula efectora T.
- 40 40. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 36, en donde la unión del anticuerpo de unión a GITR o el fragmento de unión a antígeno para una célula T resulta en la modulación de la degradación de I- $\kappa$ B en la célula T.
41. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 36, en donde la unión del anticuerpo de unión a GITR o el fragmento de unión a antígeno para una célula T resulta en la modulación de la actividad GITR en la célula T.
- 45 42. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 36, en donde la unión del fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de unión a GITR para un receptor de célula T que modula la célula T que induce la señalización en una célula efectora T.

43. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en la reivindicación 36, en donde el uso comprende la administración del antígeno antes de la administración de, o antes de la co-administración con, el anticuerpo de unión a GITR o el fragmento de unión a antígeno.
- 5 44. El fragmento de unión de anticuerpo o antígeno de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 26 para uso como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 36-43, en donde la respuesta inmunológica comprende una respuesta inmunológica humoral.

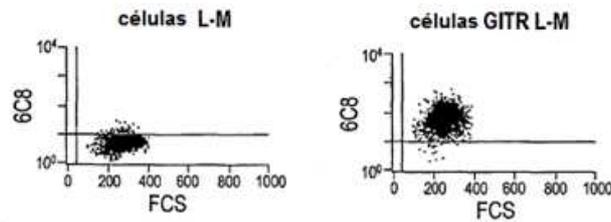


*Fig. 1*

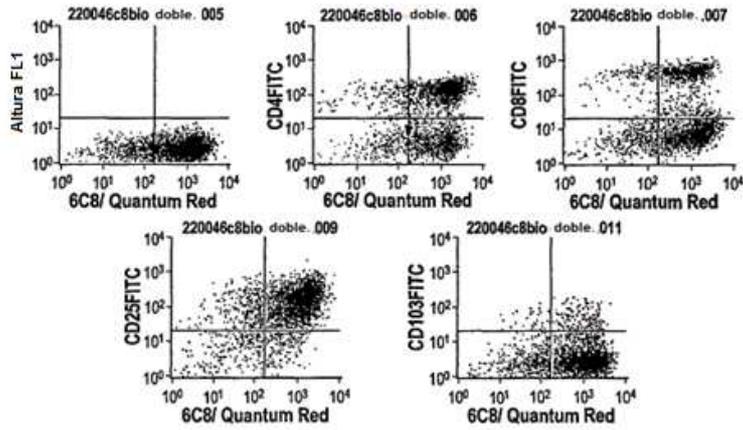
GITR Humano  $\alpha$  de ratón (6C8)



*Fig. 2*



*Fig. 3*



*Fig. 4*

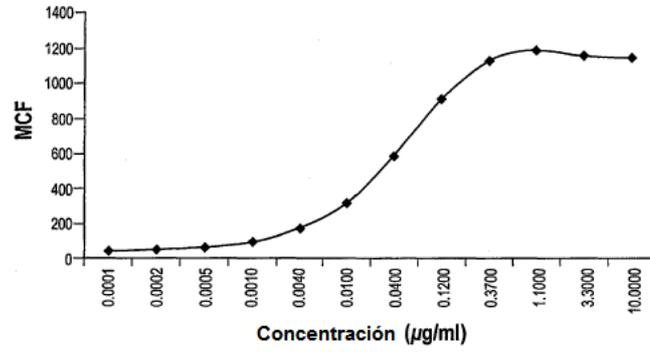


Fig. 5

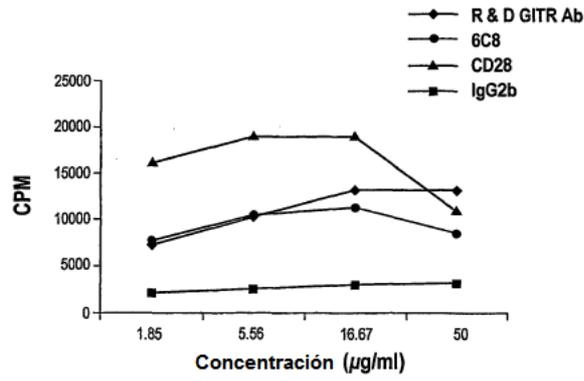
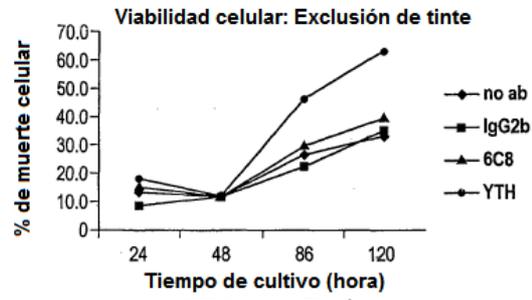
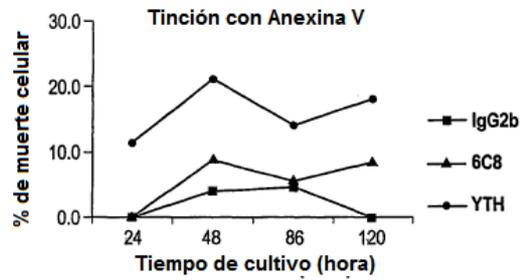


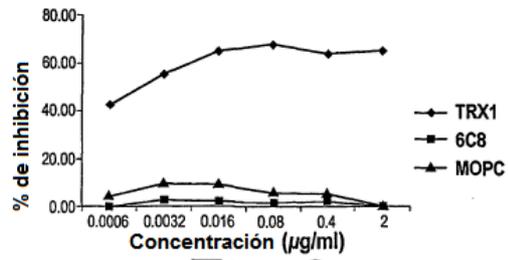
Fig. 6



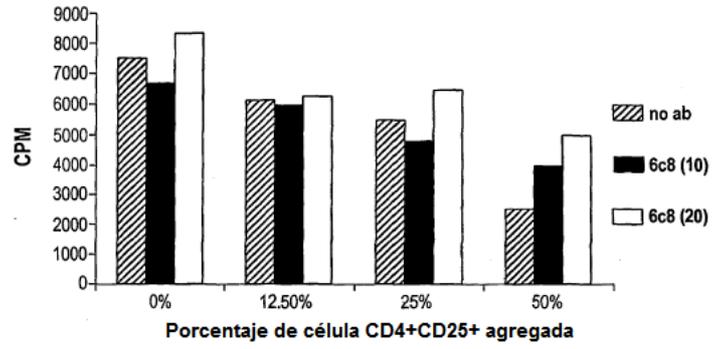
*Fig. 7A*



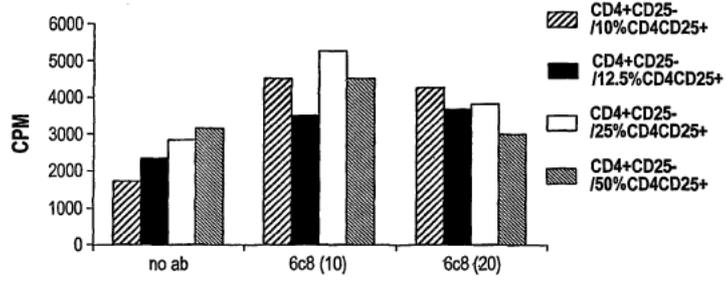
*Fig. 7B*



*Fig. 8*



*Fig. 9*



*Fig. 10*

Efecto de anti-GITR en degradación I-κB (normalizado a β-actina); activación por medio de CD3

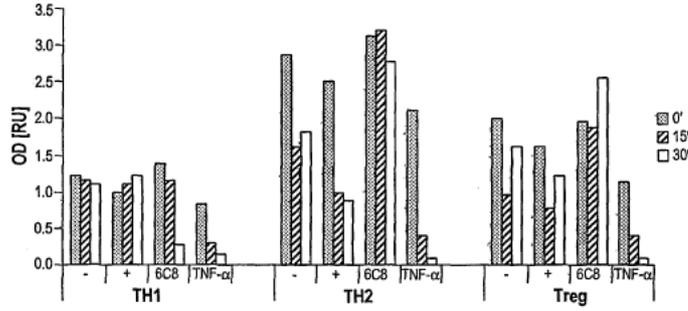


Fig. 11

Efecto de anti-GITR en fosforilación I-κB (normalizado con I-κB total y β-actina); activación por medio de CD3

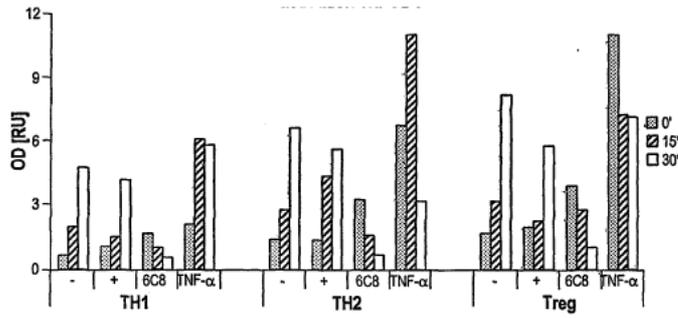
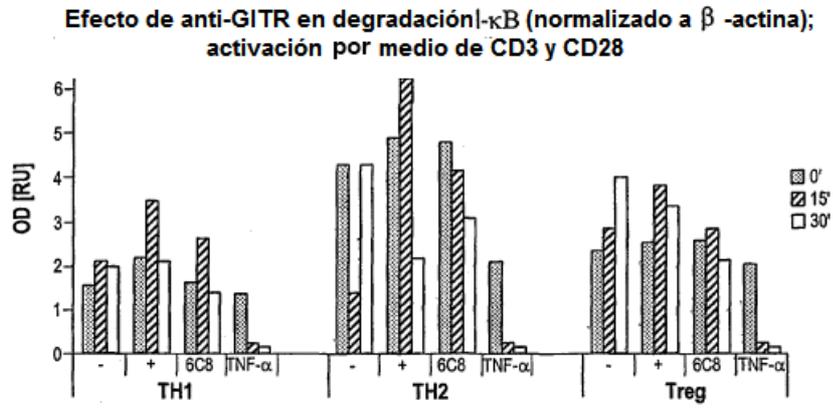
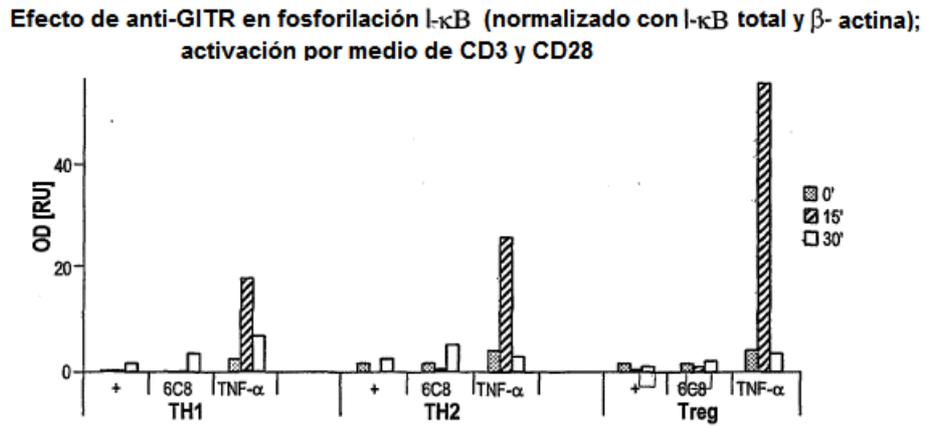


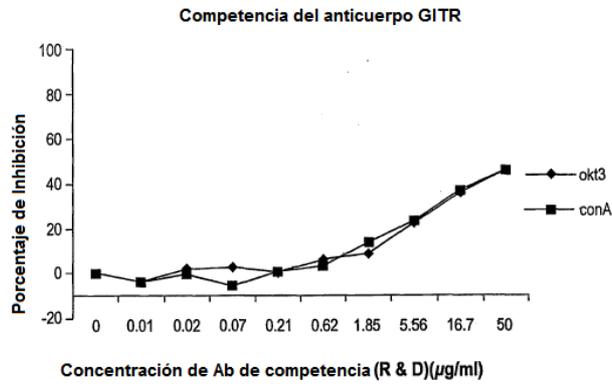
Fig. 12



*Fig. 13*

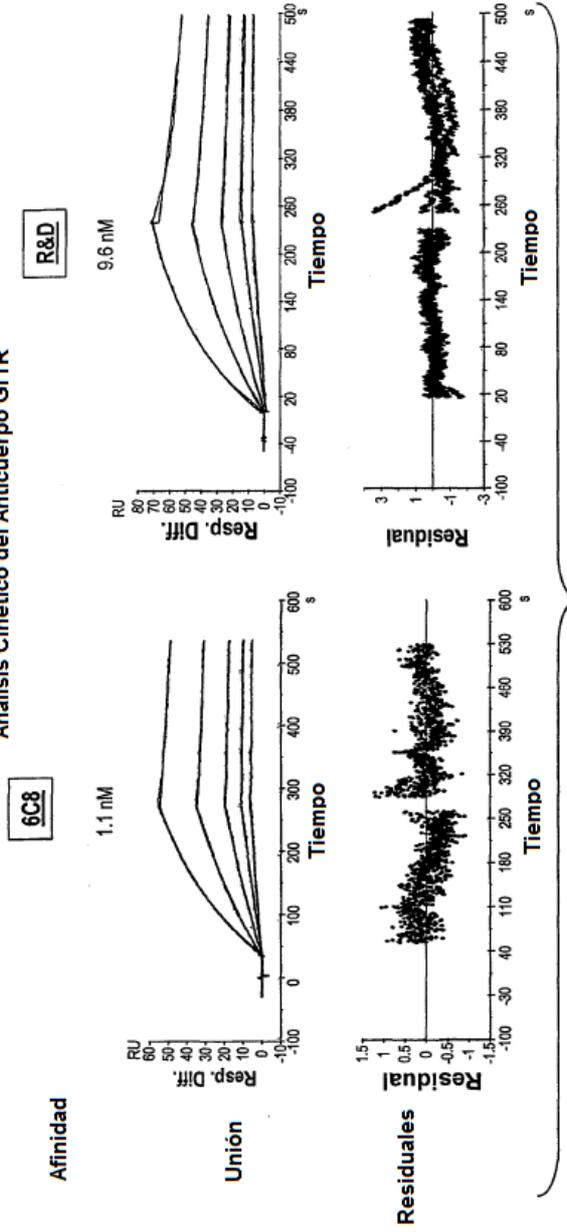


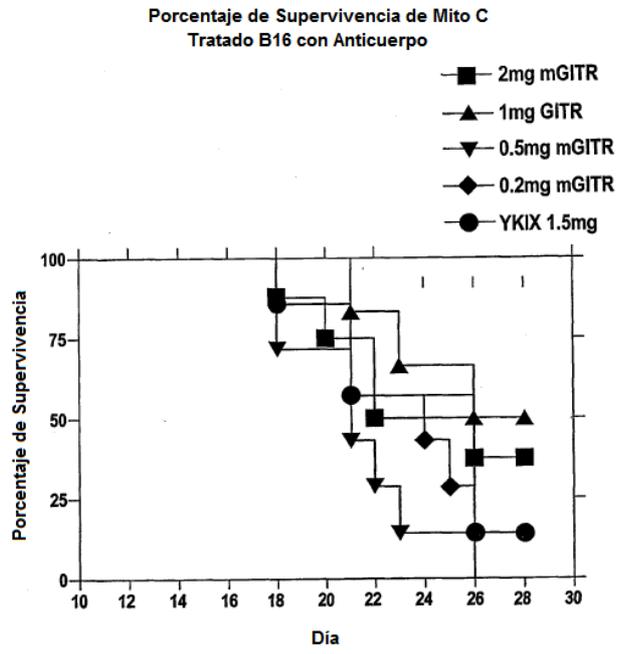
*Fig. 14*



*Fig. 15*

Análisis Cinético del Anticuerpo GITR





*Fig. 17*

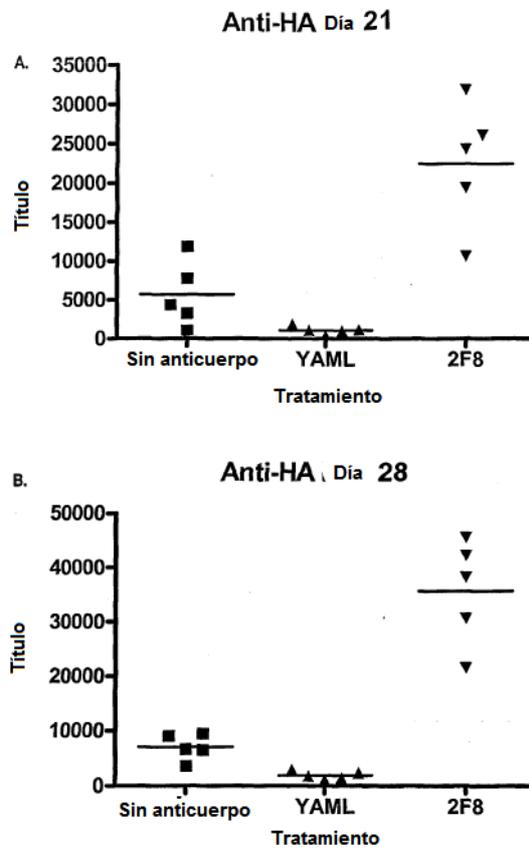
**6C8 VHD**

- A. ATGGACAGACTTACATTCTCATTCCCTGCTGCTGATTGTCCCTGCA  
TATGTCTTGTCCCAGTTACTCTAAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATT  
GAAGCCCTCACAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTT  
TCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTAGGCTGGATTCTGCAGCCT  
TCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCGCACATTTGGTGGGATGA  
TGATAAGTACTATAATCCATCCCTGAAGAGCCAGCTCACAATCTCC  
AAGGATACCTCCAGAAACCAGGTATTCCTCAAGATCACCAGTGTG  
GACACTGCAGATGCTGCCACTTACTACTGTGCTCGAACTAGGAGG  
TACTCCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACACTAGTCACAGTC  
TCCTCA
- B. MDRLTFSFLLLIVPAYVLSQVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSL  
TSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNPSLKSQLTISKDTS  
RNQVFLKITSVDTADAATYYCARTRRYFPFAYWGQGLVTVSS

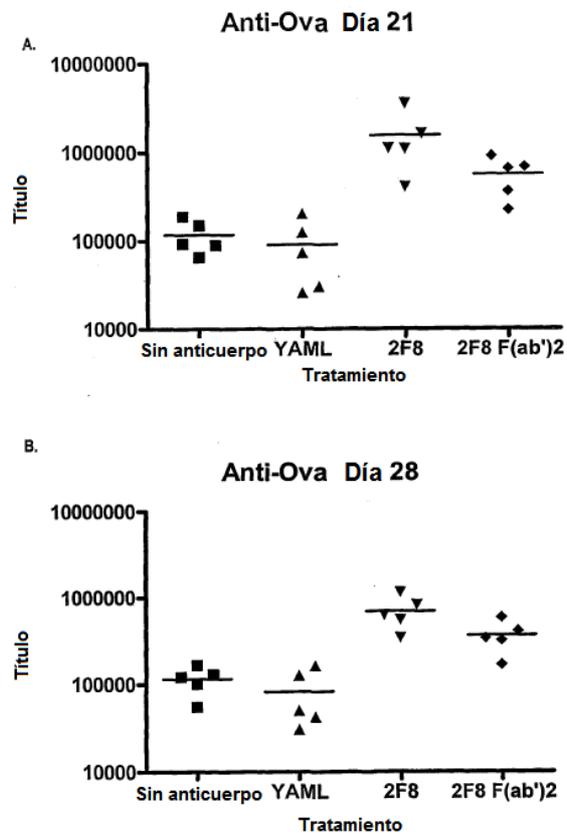
**6C8 VKA**

- C. ATGGAGACACAGTCTCAGGTCTTTGTATACATGTTGCTGTGGTTG  
TCTGGTGTTGATGGAGACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCA  
TGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCC  
AGTCAGAATGTGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCA  
GGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTAC  
AGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGAT  
TTCACTCTACCATCAACAATGTGCACTCTGAAGACTTGGCAGAGT  
ATTTCTGTCAACAATAAACACCGATCCGCTCACGTTCCGGAGCTGG  
GACCAAGCTGGAAATCAA
- D. METQSQVFVYMLLWLSGVDGDIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKA  
SQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALYSAFYRYSGVPDRFTGSGSGTDF  
TLTINNVSSEDLAEYFCQQYNTDPLTFGAGTKLEIK

*Fig. 18*



*Fig. 19*



*Fig. 20*