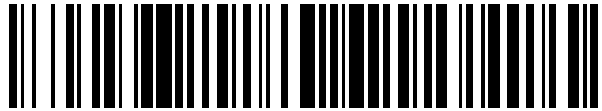


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 916**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2005 E 05791827 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 1791869**

54 Título: **Anticuerpos anti-OX40L**

30 Prioridad:

17.09.2004 EP 04022158
23.12.2004 EP 04030546

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.12.2013

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
GRENZACHERSTRASSE 124
4070 BASEL, CH

72 Inventor/es:

ENDL, JOSEF;
EUGUI, ELSIE;
FUENTES, MARIA;
GRAUS, YVO;
LABRIJN, ARAN;
LANZENDOERFER, MARTIN;
PARREN, PAUL;
REBERS, FRANK;
SCHUMACHER, RALF;
SEEBER, STEFAN;
VAN DE WINKEL, JAN y
VAN VUGT, MARTINE

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 433 916 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-OX40L

5 La presente invención se refiere de manera general a anticuerpos anti-OX40L y, en particular, a anticuerpos anti-OX40L que no se unen al factor del complemento C1q, y a composiciones farmacéuticas y usos de los mismos. Preferentemente, dichos anticuerpos son anticuerpos humanos o humanizados.

10 OX40L humano (gp34, SwissProt nº P23510) se expresa sobre células B activadas y células dendríticas tras la unión de CD40/CD40L, y sobre células endoteliales en tejidos inflamatorios (Revisión: Weinberg A.D., Trends Immunol. 23:102-109, 2002). Se ha aislado en primer lugar a partir de células leucémicas humanas infectadas por VLTH-1 (inmortalización de estas células T mediante la generación de un bucle autocrino con OX40). Se menciona OX40L y los anticuerpos contra el mismo en, por ejemplo, los documentos WO nº 95/12673, nº 95/21915, nº 99/15200; Baum P.R. *et al.*, EMBO J. 13:3992-4001, 1994; Imura A. *et al.*, Blood 89:2951-2958, 1997; Imura A. *et al.*, J. Exp. Med. 183:2185-2195, 1996; Kjaergaard J. *et al.*, J. Immunol. 167:6669-6677, 2001; Lane P., J. Exp. Med. 191:201-206, 2000; Mallett S. y Barclay A.N., Immunol. Today 12:220-223, 1991; Mallett S., *et al.*, EMBO J. 9:1063-1068, 1990; Ndhlovu L.C. *et al.*, J. Immunol. 167:2991-2999, 2001; Ohshima Y. *et al.*, J. Immunol. 159:3838-3848, 1997; Rogers P.R. *et al.*, Immunity 15:445-455, 2001; Stüber E. y Strober W., J. Exp. Med. 183:979-989, 1996; Stüber E. *et al.*, Gastroenterology 115:1205-1215, 1998; Takahashi Y. *et al.*, J. Virol. 75:6748-6757, 2001; Takasawa N. *et al.*, Jpn. J. Cancer Res. 92:377-382, 2001; Taylor L. y Schwarz H., J. Immunol. Meth. 255:67-72, 2001; Weinberg A.D. *et al.*, Nature Medicine 2:183-189, 1996; Weinberg A.D. *et al.*, Semin. Immunol. 10:471-480, 1998; Weinberg A.D., Trends Immunol. 23:102-109, 2002; Wu T. *et al.*, Transplant. Proc. 33:217-218, 2001; Higgins L.M. *et al.*, J. Immunol. 162:486-493, 1999; Yoshioka T. *et al.*, Eur. J. Immunol. 30:2815-2823, 2000. OX40L humano es el ligando para OX40 humano (CD134) que se expresa transitoriamente sobre las células T CD4⁺ activadas. La unión de OX40 a su ligando conduce a una señal de coestimulación para la activación de las células T. Se ha descrito que la interacción OX40/OX40L crea una señal bidireccional (Matsumura Y. *et al.*, J. Immunol. 163:3007-3011, 1999; Kotani A. *et al.*, Immunol. Lett. 84:1-7, 2002). Además, la interacción OX40/OX40L media en la adhesión de las células T activadas a las células endoteliales en tejidos inflamatorios. Debido a que OX40L sólo se expresa transitoriamente sobre células B activadas, CD y endoteliales, los anticuerpos de OX40L deberían bloquear selectivamente la activación de las células T y la adhesión de las células endoteliales durante una respuesta inflamatoria, pero sin afectar a las células T periféricas no activadas. Yoshioka A. *et al.* (Eur. J. Immunol. 30:2815-2823, 2000) han demostrado el potencial terapéutico de un mAb anti-mOX40L neutralizante en un modelo de ratón de la artritis reumatoide. La administración del mismo mejoró drásticamente la severidad de la enfermedad. Este anticuerpo mostró actividades similares en otros modelos de enfermedad relacionados, por ejemplo, en la enfermedad inflamatoria de la piel, la enfermedad autoinmunitaria experimental (EAE), la EICH, la enfermedad intestinal inflamatoria murina (Yoshioka A. *et al.*, Eur. J. Immunol. 30:2815-2823, 1999; Salek-Ardakani S. *et al.*, J. Exp. Med. 198:315-324, 2003; Burgess J.K. *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 113:683-689, 2004; Hoshino A. *et al.*, Eur. J. Immunol. 33:861-869, 2003; Arestides R.S. *et al.*, Eur. J. Immunol. 32:2874-2880, 2002; Nohara C. *et al.*, J. Immunol. 166:2108-2115, 2001; Weinberg A.D. *et al.*, J. Immunol. 162:1818-1826, 1999; Higgins L.M. *et al.*, J. Immunol. 162:486-493, 1999; Humphreys I.R. *et al.*, J. Exp. Med. 198:1237-1242, 2003; Akiba H. *et al.*, J. Exp. Med. 191:375-380, 2000; Ishii N. *et al.*, Eur. J. Immunol. 33:2372-2381, 2003; Blazar B.R. *et al.*, Blood 101:3741-3748, 2003; Tsukada N. *et al.*, Blood 95:2434-2439, 2000; Akiba H. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 251:131-136, 1998.

45 Los anticuerpos contra OX40L han sido investigados por sus efectos antiinflamatorios en diversos modelos de enfermedad (Sugamura K. *et al.*, Nat. Rev. Immunol. 4:420-431, 2004).

50 Tanaka Y. *et al.*, Int. J. Cancer 36:549-555, 1985; Tozawa H. *et al.*, Int. J. Cancer 41:231-238, 1988; y Miura S. *et al.*, Mol. Cell. Biol. 11:1313-1325, 1991, describen anticuerpos monoclonales de ratón denominados TARM-34 y TAG34 que reaccionan con antígenos de superficie de líneas de linfocitos humanos que portan un virus de tipo I de la leucemia de células T humanas (VLTH1). El anticuerpo TAG-34 se encuentra disponible comercialmente de MBL International Corporation. TAG-34 se une también a OX40L.

Descripción resumida de la invención

55 La invención se refiere a un anticuerpo, preferentemente a un anticuerpo monoclonal, caracterizado porque dicho anticuerpo se une a OX40L, contiene una parte Fc de origen humano y no se une al factor del complemento humano C1q y/o al receptor de Fcγ humano sobre las células NK.

60 La invención se refiere además a un anticuerpo, preferentemente a un anticuerpo monoclonal, caracterizado porque dicho anticuerpo contiene una parte Fc de origen humano, se une a OX40L y a OX40L desnaturizado (en una transferencia western) a una concentración de anticuerpos de 100 ng. Dicho anticuerpo se une al mismo epítipo del polipéptido OX40L que el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal LC.001. Dichos anticuerpos son, por ejemplo, LC.001, LC.033 y LC.060. Estos anticuerpos son preferentemente de tipo IgG1 humano (tipo salvaje) o no

se unen al factor del complemento C1q humano y/o al receptor de Fcy humano sobre las células NK.

- 5 Se da a conocer además en la presente memoria un anticuerpo que se une a OX40L caracterizado porque comprende una cadena ligera variable y una cadena pesada variable, caracterizado porque la cadena pesada variable comprende CDR1, CDR2 y CDR3, caracterizado porque CDR3 se selecciona de entre SEC ID nº 33-38. Resulta especialmente preferente que CDR1 se seleccione de entre SEC ID nº 21 y 25, CDR2 se selecciona de entre SEC ID nº 26 y 32, y CDR3 se selecciona de entre SEC ID nº 33 y 38.
- 10 Se da a conocer en la presente memoria un anticuerpo caracterizado porque comprende una cadena ligera variable y una cadena pesada variable, caracterizado porque la cadena ligera variable comprende CDR1, CDR2 y CDR3, caracterizado porque CDR3 se selecciona de entre SEC ID nº 51-57. Resulta especialmente preferente que CDR1 se seleccione de entre SEC ID nº 39 y 44, CDR2 se selecciona de entre SEC ID nº 45 y 50, y CDR3 se selecciona de entre SEC ID nº 51 y 57.
- 15 Se da a conocer en la presente memoria un anticuerpo caracterizado porque comprende una cadena pesada variable y una cadena ligera variable, caracterizado porque la cadena pesada variable comprende CDR1, CDR2 y CDR3, caracterizado porque CDR3 de la cadena pesada se selecciona de entre SEC ID nº 33 y 38, y CDR3 de la cadena ligera se selecciona de entre SEC ID nº 51 y 57. Resulta especialmente preferente que la cadena pesada variable comprenda CDR1 seleccionado de entre SEC ID nº 21 y 25, CDR2 se selecciona de entre SEC ID nº 26 y 32, y CDR3 se selecciona de entre SEC ID nº 33 y 38, y la cadena ligera variable comprende CDR1 seleccionado de entre SEC ID nº 39 y 44, CDR2 se selecciona de entre SEC ID nº 45 y 50, y CDR3 se selecciona de entre SEC ID nº 51 y 57.
- 20
- 25 Todas las CDR se seleccionan independientemente unas de otras, aunque de manera que por norma el anticuerpo se una a OX40L. Por lo tanto, las CDR de las cadenas ligeras y pesadas del mismo anticuerpo LC pueden combinarse o las CDR de cadena ligera de LC.001 con las CDR de cadena pesada de LC.001, LC.059 ó LC.063. Las CDR en cada cadena se encuentran separadas por aminoácidos de marco.
- 30 El anticuerpo según la invención preferentemente está caracterizado porque el anticuerpo comprende CDR seleccionadas independientemente de entre el grupo que consiste de:
- a) las CDR variables de cadena ligera (V_L) de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 y las CDR variables de cadena pesada (V_H) de SEC ID nº 2, o un fragmento de unión a OX40L de las mismas.
- 35 El anticuerpo según la invención preferentemente está caracterizado porque dicho anticuerpo comprende una región variable seleccionada independientemente de entre el grupo que consiste de:
- a) el dominio variable de cadena ligera (V_L) definido por la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 y el dominio variable de cadena pesada (V_H) definido por SEC ID nº 2,
- 40 o un fragmento de unión a OX40L de los mismos
- 45 El anticuerpo según la invención preferentemente está caracterizado porque la región variable de cadena ligera humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada independientemente de entre el grupo que consiste de la SEC ID nº 1.
- 50 El anticuerpo según la invención preferentemente está caracterizado porque la región variable de cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada independientemente de entre el grupo que consiste de la SEC ID nº 2.
- 55 El anticuerpo según la invención preferentemente está caracterizado porque el anticuerpo comprende el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEC ID nº y el dominio variable de cadena pesada definido por SEC ID nº 2.
- 60 El anticuerpo según la invención preferentemente está caracterizado porque la región constante de cadena pesada humana comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada independientemente de entre el grupo que consiste de la SEC ID nº 14. El anticuerpo según la invención preferentemente está caracterizado porque el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera κ de SEC ID nº 13 ó la región constante de cadena ligera de SEC ID nº 61.
- Preferentemente, un anticuerpo según la invención se caracteriza por la unión a OX40L y por ser de la clase IgG1 humana (tipo salvaje) y comprende como la cadena pesada γ , la SEC ID nº 58. Resulta especialmente preferente un anticuerpo que comprende como a), la cadena pesada γ SEC ID nº 58 y como cadena ligera kappa SEC ID nº 61.

Una realización adicional de la invención es un anticuerpo de unión a OX40L, caracterizado porque es producido por la línea celular hu-mAb<hOX40L>LC.001.

5 El anticuerpo según la invención preferentemente es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.

El anticuerpo según la invención preferentemente se caracteriza por la unión a OX40L con un valor de K_D inferior a 10^{-8} M (10^{-12} a 10^{-9} M), más preferentemente por un intervalo de K_D de entre 10^{-12} y 10^{-9} M en un ensayo BIAcore.

10 El anticuerpo según la invención preferentemente inhibe la interacción de OX40L con OX40 en un ELISA utilizando OX40L inmovilizado (preferentemente OX40L biotinilado inmovilizado sobre una superficie con estreptavidina) a una concentración de recubrimiento de 0,5 mg/ml con un valor de IC_{50} no superior a 4 nM. Más preferentemente el valor de IC_{50} se encuentra comprendido en el intervalo de entre 1 y 4 nM.

15 El anticuerpo según la invención preferentemente se caracteriza porque la no unión del anticuerpo al factor de complemento C1q se refiere a una medición en ensayo ELISA en la que la unión máxima (B_{max}) del anticuerpo a una concentración de 10 mg/ml a C1q es de 30% o inferior, preferentemente de 20% o inferior en comparación con la B_{max} del anticuerpo LC.001.

20 Preferentemente, el anticuerpo no se une a Fc γ RI, Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIIA humanos. Resulta especialmente preferente que el anticuerpo no se une al receptor de Fc γ humano sobre las células efectoras NK.

25 El anticuerpo según la invención preferentemente se caracteriza porque la no unión del anticuerpo al receptor de Fc γ sobre las células NK se refiere a un ensayo en el que la unión máxima (B_{max}) del anticuerpo a una concentración de 20 mg/ml a las células NK es de 20% o inferior, preferentemente de 10% o inferior en comparación con la B_{max} del anticuerpo LC.001.

30 El anticuerpo según la invención preferentemente se caracteriza porque no se une a Fc γ RI. Lo anterior significa que el anticuerpo se caracteriza por un valor de EC_{50} que es cinco veces o más, preferentemente siete veces o más, tal como ocho veces o más, el valor EC_{50} de LC.001, medido en un ensayo que analiza la unión del anticuerpo a una concentración comprendida entre 0,078 y 10 mg/ml a una célula de linfoma de células B que no presenta Fc γ RIIA ni Fc γ RIIB, pero que expresa Fc γ RI recombinante.

35 El anticuerpo según la invención preferentemente se caracteriza por ser un anticuerpo IgG4 ó un anticuerpo IgG1 que comprende por lo menos una mutación de aminoácido, preferentemente en la parte Fc humana, que causa la no unión al factor del complemento C1q y/o la no unión al receptor de Fc γ humano sobre las células NK.

El anticuerpo según la invención preferentemente se caracteriza porque no activa el factor del complemento C3.

40 El anticuerpo según la invención preferentemente se caracteriza por ser de la subclase IgG4 humana. En una realización preferente adicional de la invención, el anticuerpo se caracteriza por ser de cualquier clase de IgG, siendo preferentemente IgG1 ó IgG4, conteniendo por lo menos una mutación en E233, L234, L235, G236, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 y/o P329 (numeración según el índice EU). Resultan especialmente preferentes las mutaciones de IgG1 PVA236, L234A/L235A y/o GLPSS331, así como la mutación de IgG4 L235E.
45 Resulta adicionalmente preferente que el anticuerpo de subclase IgG4 contenga la mutación S228P o las mutaciones S228P y L235E (Angal S. *et al.*, Mol. Immunol. 30:105-108, 1993).

50 Por lo tanto, el anticuerpo según la invención preferentemente es un anticuerpo de subclase IgG1 humana, que contiene una o más mutaciones de entre PVA236, GLPSS331 y/o L234A/L235A (numeración según el índice EU).

Preferentemente, el anticuerpo según la invención se caracteriza por la unión a OX40L, por ser de clase IgG1 que contiene la mutación L234A/L235A y que comprende como cadena pesada γ , la SEC ID n° 59.

Resulta especialmente preferente un anticuerpo que comprende como

55 a) cadena pesada γ , SEC ID n° 59, y como cadena ligera kappa, SEC ID n° 61,

Preferentemente, el anticuerpo según la invención se caracteriza por ser de clase IgG4, que contiene la mutación S228P y que comprende como cadena pesada γ , la SEC ID n° 60.

60 Resulta especialmente preferente un anticuerpo que comprende como

a) cadena pesada y, SEC ID nº 60, y como cadena ligera kappa, SEC ID nº 61,

El anticuerpo según la invención preferentemente se caracteriza porque no induce citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

5 El anticuerpo según la invención preferentemente se caracteriza preferentemente porque no induce citotoxicidad celular dependiente del complemento (ADCC).

10 Por lo tanto, la invención comprende anticuerpos anti-OX40L o cadenas pesadas o ligeras individuales caracterizadas por sus CDR, regiones variables, secuencias de aminoácidos completas o híbridomas, y que no comprende ninguna parte Fc o ningún tipo de parte Fc, preferentemente Fc de IgG1 humana o Fc de IgG4 humana, no modificada de origen humano o modificada con las mutaciones anteriormente indicadas.

15 Por lo tanto, la invención comprende además anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales, caracterizada porque dichos anticuerpos se unen a OX40L, contiene una parte Fc de origen humano y no se une al factor del complemento humano C1q y/o al receptor de Fcγ humano sobre las células NK, siendo de tipo IgG4 humano o de tipo IgG1 humano o tipo IgG4 humano, ambos modificados con las mutaciones anteriormente indicadas.

20 Por lo tanto, la invención comprende además anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales, caracterizado porque dichos anticuerpos se unen a OX40L y a OX40L desnaturalizado (en una transferencia western) a una concentración de anticuerpo de 100 ng. Dicho anticuerpo se une al mismo epítipo del polipéptido OX40L que el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal LC.001. Los anticuerpos no comprenden ninguna parte Fc ni cualquier tipo de parte Fc, preferentemente IgG1 humana o IgG4 humana, de tipo salvaje o modificada con las mutaciones anteriormente indicadas.

25 Los anticuerpos según la invención presentan nuevas e inventivas propiedades que causan un beneficio para el paciente que necesita una terapia con anticuerpos contra OX40L, especialmente para un paciente que sufre trastornos inflamatorios, especialmente artritis reumatoide, asma alérgica y EICH durante el trasplante (ver también Sugamura K. *et al.*, Nat. Rev. Immunol. 4:420-431, 2004).

30 Una realización adicional de la invención es una molécula de ácidos nucleicos codificante de una molécula de anticuerpo, una cadena variable o un dominio CDR de la misma según la invención.

35 En una realización preferente de la invención, el anticuerpo es un Fab, F(ab')₂ o un fragmento de cadena sencilla.

Una realización adicional de la invención es un vector que comprende la molécula de ácidos nucleicos según la invención.

40 Una realización adicional de la invención es una célula huésped que comprende el vector según la invención.

Una realización adicional de la invención es un método para la preparación de un anticuerpo según la invención, que comprende cultivar la célula huésped según la invención bajo condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpo y la recuperación de dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.

45 Una realización adicional de la invención es una composición, preferentemente una composición farmacéutica o diagnóstica del anticuerpo según la invención.

Una realización adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la invención y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 Una realización adicional de la invención es un método para el tratamiento de un paciente que necesita terapia, caracterizada por la administración en el paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo según la invención.

55 Una realización adicional de la invención es la utilización de un anticuerpo según la invención para la terapia, preferentemente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, especialmente para el tratamiento y/o la prevención de la artritis reumatoide, el asma y la EICH (enfermedad del injerto contra el huésped).

60 Una realización adicional de la invención es la utilización de un anticuerpo según la invención para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades inflamatorias, preferentemente para el tratamiento de la artritis reumatoide, el asma y la EICH.

Una realización adicional de la invención es un kit diagnóstico que comprende un anticuerpo según la invención, una

molécula de ácidos nucleicos según la invención, un vector según la invención o una célula huésped según la invención.

Además, se dan a conocer los ítems siguientes:

- 5 1. Un anticuerpo de unión a OX40L, caracterizado porque el anticuerpo comprende CDR de la cadena ligera (V_L), CDR variables de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 y las CDR de la cadena pesada variable (V_H) de SEC ID nº 2.
- 10 2. El anticuerpo según el ítem 1, caracterizado porque comprende el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 y el dominio variable de cadena pesada definido en SEC ID nº 2.
- 15 3. El anticuerpo según cualquiera de los ítems 1 a 2, caracterizado porque el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa definido en SEC ID nº 13 ó la región constante de cadena ligera de SEC ID nº 61.
- 20 4. El anticuerpo según cualquiera de los ítems 1 a 3, caracterizado porque el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada definida en SEC ID nº 14 ó SEC ID nº 58, nº 59 ó nº 60.
- 25 5. El anticuerpo según cualquiera de los ítems 1 a 4, caracterizado porque la región constante de cadena ligera kappa se define en SEC ID nº 61, su región constante pesada se define en SEC ID nº 58, nº 59 ó nº 60.
6. El anticuerpo según el ítem 1, caracterizado porque es producido por la línea celular hu-mAb<hOX40L>LC.001.
- 30 7. El anticuerpo según cualquiera de los ítems 1 a 5, caracterizado porque el anticuerpo es un fragmento Fab, $F(ab')_2$ o un fragmento de cadena sencilla.
8. Una molécula de ácidos nucleicos codificante de una molécula de anticuerpo según cualquiera de los ítems 1 a 7.
- 35 9. Un vector que comprende la molécula de ácidos nucleicos del ítem 8.
10. Una célula huésped que comprende el vector del ítem 9.
- 40 11. Un método para la preparación de una molécula de anticuerpos según cualquiera de los ítems 1 a 7, que comprende cultivar la célula huésped del ítem 10 bajo condiciones que permitan la síntesis de dicha molécula de anticuerpos y recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.
- 45 12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquiera de los ítems 1 a 7 y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Un anticuerpo según se define en cualquiera de los ítems 1 a 7 para la utilización en la profilaxis y el tratamiento de los trastornos inflamatorios.
- 60 14. La utilización de un anticuerpo según se define en cualquiera de los ítems 1 a 7 para la preparación de un medicamento para la profilaxis y el tratamiento de los trastornos inflamatorios.

Descripción detallada de la invención

- 50 El término "OX40L" se refiere a una proteína membranal de tipo II perteneciente a la familia de ligandos de TNF. Son otros nombres, receptor ACT-4, CD134L, gp34 ó TNF4_Humano. Presenta un peso molecular de 34 kDa y se encuentra almacenado en SwissProt con el número de acceso P23510.
- 55 El término "OX40" se refiere al receptor que se une a OX40L. Es una proteína membranal de tipo I perteneciente a la familia de receptores de TNF. Son otros nombres, ACT4, receptor de OX40L, antígeno CD134, antígeno ACT35 y TNR4_Humano. Presenta un peso molecular de 50 kDa y se encuentra almacenado en SwissProt con el número de acceso P43489.
- 60 El término "anticuerpo" comprende las diversas formas de los anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, anticuerpos completos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos

genéticamente manipulados (anticuerpos variantes o mutantes), con la condición de que se conserven las propiedades características según la invención. Resultan especialmente preferente los anticuerpos monoclonales humanos o humanizados, especialmente como anticuerpos humanos recombinantes.

5 Las expresiones “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpos monoclonales” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición de aminoácidos.

10 La expresión “anticuerpo quimérico” se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una región variable, es decir una región de unión, de una procedencia o especie y por lo menos una parte de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, habitualmente preparada mediante técnicas de ADN recombinante. Los anticuerpos quiméricos que comprenden una región variable murina y una región constante humana resultan preferentes. Otras formas preferentes de “anticuerpos quiméricos” comprendidas dentro de la presente invención son aquéllas en las que la región constante ha sido adicionalmente modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la unión del receptor de Fc (FcR). Dichos anticuerpos quiméricos también se denominan “anticuerpos de cambio de clase”. Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que comprenden segmentos de ADN codificantes de regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de ADN codificantes de regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos implican técnicas convencionales de ADN recombinante y de transfección génica son bien conocidas de la técnica Ver, por ejemplo, Morrison S.L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984; patentes US nº 5.202.238 y nº 5.204.244.

25 La expresión “anticuerpo humanizado” se refiere a anticuerpos en los que el marco o las “regiones determinantes de complementariedad” (CDR) han sido modificadas para que comprendan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente de la de la inmunoglobulina parental. En una realización preferente, se injerta una CDR murina en la región marco de un anticuerpo humano para preparar un “anticuerpo humanizado”. Ver, por ejemplo, Riechmann L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1988, y Neuberger M.S. *et al.*, Nature 314:268-270, 1985. Son CDR particularmente preferentes las que representan secuencias que reconocen los antígenos indicados anteriormente para los anticuerpos quiméricos y bifuncionales. Otras formas de “anticuerpos humanizados” comprendidas dentro de la presente invención son aquéllas en las que la región constante ha sido adicionalmente modificada o cambiada respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o a la del receptor de Fc (FcR).

35 La expresión “anticuerpo humano”, tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos del estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5:368-374, 2001). También pueden producirse anticuerpos humanos en animales transgénicos (por ejemplo ratones) que sean capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulinas. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras el reto de antígeno (ver, por ejemplo, Jakobovits A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555, 1993; Jakobovits A. *et al.*, Nature 362:255-258, 1993; Brueggemann M. *et al.*, Year Immunol. 7:33-40, 1993). También pueden producirse anticuerpos humanos en bibliotecas de expresión fágica (Hoogenboom H.R. y Winter G.J., Mol. Biol. 227:381-388, 1992; Marks J.D. *et al.*, J. Mol. 222:581-597, 1991). Las técnicas de Cole *et al.* y de Boerner *et al.* también se encuentran disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77, 1985; y Boerner P. *et al.*, J. Immunol. 147:86-95, 1991). Tal como ya se ha indicado para los anticuerpos quiméricos y humanizados según la invención, la expresión “anticuerpo humano” tal como se utiliza en la presente memoria también comprende los anticuerpos que se han modificado en la región constante para generar las propiedades según la invención, especialmente con respecto a la unión de C1q y/o la unión de FcR, por ejemplo mediante “intercambio de clase”, es decir, el cambio o mutación de partes Fc (por ejemplo de IgG1 a IgG4 y/o la mutación IgG1/IgG4). Además, la invención comprende anticuerpos monoclonales humanos contra OX40L que se unen a C1q y/o a FcR. Dichos anticuerpos humanos se caracterizan por una elevada selectividad para OX40L humano vs. OX40L de ratón (>30 veces menos unión a OX40L de ratón que a OX40L humano) y no muestran unión no específica a TNF α o a CD40L hasta una concentración de 500 nM. Dichos anticuerpos resultan útiles para la generación de anticuerpos que no se unen a C1q y/o a FcR.

60 La expresión “anticuerpo humano recombinante”, tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, se expresan, se crean o se aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos aislados a partir de una célula huésped, tal como una célula NS0 o CHO, o de un animal (por ejemplo un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana o para anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped. Dichos anticuerpos recombinantes humanos

5 presentan regiones variables y constantes en una forma reorganizada. Los anticuerpos recombinantes humanos según la invención han sido sometidos a hipermutación somática *in vivo*. De esta manera, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas y relacionadas con secuencias V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente en el repertorio *in vivo* de anticuerpos de la línea germinal humana.

10 La expresión "región variable" (región variable de una cadena ligera (V_L), región variable de una cadena pesada (V_H)) tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cada uno de la pareja de cadena ligera y cadena pesada que participa directamente en la unión del anticuerpo con el antígeno. Los dominios de cadenas ligera y pesada variables presentan la misma estructura general y cada dominio comprende cuatro regiones marco (FR) cuyas secuencias se encuentran ampliamente conservadas, conectadas mediante tres "regiones hipervariables" (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones marco adoptan una conformación de láminas β y las CDR pueden formar bucles que conectan la estructura de láminas β . Las CDR en cada cadena son mantenidas en su estructura tridimensional por las regiones de marco y forman conjuntamente con las CDR de la otra cadena el sitio de unión de antígeno. Las regiones CDR3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de los anticuerpos según la invención y por lo tanto proporcionan un objetivo adicional de la invención.

20 Las expresiones "región hipervariable" o "parte de unión a antígeno del anticuerpo" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a los residuos aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos aminoácidos de las "regiones determinantes de complementariedad" o "CDR". Las regiones "de marco" o "FR" son aquellas regiones de dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se definen en la presente memoria. Por lo tanto, las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo comprenden, de extremo N-terminal a extremo C-terminal, los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las CDR en cada cadena se encuentran separadas por aminoácidos de marco. Especialmente, la CDR3 de la cadena pesada es la región que contribuye más a la unión de antígeno. Las regiones CDR y FR se determinan según la definición estándar de Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

25 Las expresiones "ácido nucleico o molécula de ácido nucleico", tal como se utilizan en la presente memoria, pretenden incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácidos nucleicos puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es de ADN bicatenario.

30 Un ácido nucleico se encuentra "operablemente ligado" en el caso de que se sitúe en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretorio se encuentra operablemente ligado a ADN para un polipéptido en el caso de que se exprese como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecte a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se sitúe de manera que facilite la traducción. Generalmente, "operablemente ligado" se refiere a que las secuencias de ADN que se ligan son contiguas, y, en el caso de un líder secretorio, son contiguos y se encuentran en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no son necesariamente contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligación en sitios de restricción apropiados. En el caso de que dichos sitios no existan, se utilizan adaptadores oligonucleótidos sintéticos o *linker* según la práctica convencional.

35 Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se utilizan intercambiamente y la totalidad de dichas expresiones incluye la progenie. De esta manera, las expresiones "transformantes" y "células transformadas" incluyen la célula sujeta primaria y los cultivos derivados de la misma, con independencia del número de transferencias. También debe interpretarse que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en su contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o naturales. Se encuentra incluida la progenie variante que presenta la misma función o actividad biológica según el cribado realizado en la célula originalmente transformada. Resultará claro a partir del contexto se se pretenden utilizar denominaciones diferenciadas.

40 Los "dominios constantes" no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno sino que muestran diversas funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de la región constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos o las inmunoglobulinas se dividen en las clases siguientes: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Las regiones constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , ϵ , γ y μ , respectivamente. Los anticuerpos según la invención preferentemente son del tipo IgG.

45 Los anticuerpos según la invención contienen como parte F_c , preferentemente una parte F_c derivada de origen humano y preferentemente todas las demás partes de las regiones constantes humanas. La parte F_c de un

anticuerpo participa directamente en la activación del complemento, la unión de C1q, la activación de C3 y la unión del receptor de Fc. Aunque la influencia de un anticuerpo sobre el sistema del complemento depende de determinadas condiciones, la unión a C1q está causada por sitios de unión definidos en la parte Fc. Dichos sitios de unión son conocidos del estado de la técnica y se describen en, por ejemplo, Lukas T.J. *et al.*, J. Immunol. 127:2555-2560, 1981; Brunhouse R. y Cebra J.J., Mol. Immunol. 16:907-917, 1979; Burton D.R. *et al.*, Nature 288:338-344, 1980; Thommesen J.E. *et al.*, Mol. Immunol. 37:995-1004, 2000; Idusogie E.E. *et al.*, J. Immunol. 164:4178-4184, 2000; Hezareh M. *et al.*, J. Virology 75:12161-12168, 2001; Morgan A. *et al.*, Immunology 86:319-324, 1995 y la patente EP nº 0307434. Dichos sitios de unión son, por ejemplo, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 y P329 (la numeración es según el índice EU de Kabat, ver posteriormente). Los anticuerpos de las subclases IgG1, IgG2 e IgG3 habitualmente muestran activación del complemento, unión de C1q y activación de C3, mientras que IgG4 no activa el sistema del complemento, no se une a C1q y no activa C3. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "parte Fc derivada de origen humano y no se une al factor del complemento humano C1q y/o al receptor humano hFc sobre las células NK" se refiere a una parte Fc que es una parte Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG4 ó una parte Fc de un anticuerpo humano de la subclase IgG1, IgG2 ó IgG3 que se ha modificado de manera que no puede detectarse unión de C1q, activación de C3 y/o unión de FcR tal como se define posteriormente. Una "parte Fc de un anticuerpo" es una expresión bien conocida por el experto en la materia y se define basándose en el corte con papaína de los anticuerpos. Preferentemente, la parte Fc es una parte Fc humana y resulta especialmente preferente de la subclase IgG4 humana, preferentemente mutada en la región bisagra (por ejemplo S228P y/o L235E) o una parte Fc mutada de la subclase IgG1 humana. Resultan más preferentes las partes Fc que comprenden regiones constantes de cadena pesada seleccionadas de entre las regiones mostradas en SEC ID nº 14 y nº 15 ó incluidas en SEC ID nº 58, nº 59, nº 60, SEC ID nº 14 con las mutaciones L234A y L235A o la SEC ID nº 15 con la mutación S228P o las mutaciones S228P y L235E.

La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a OX40L y no se une al factor del complemento C1q, y/o al receptor de Fc. En una realización preferente de la invención, dichos anticuerpos no inducen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Preferentemente, dicho anticuerpo se caracteriza porque se une a OX40L, contiene una parte Fc derivada de origen humano y no se une al factor del complemento C1q. Más preferentemente, dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado.

Las funciones efectoras mediadas por la parte Fc de la región Fc de anticuerpo se refieren a funciones efectoras que operan tras la unión de un anticuerpo a un antígeno (estas funciones implican la activación de la cascada del complemento y/o la activación celular por un receptor de Fc).

La función de la cascada del complemento puede evaluarse mediante el ensayo de CH50. Los glóbulos rojos de oveja sensibilizados con anticuerpos anti-glóbulo rojo (EA) se añadieron a suero de ensayo para activar la ruta clásica, resultando en hemólisis. El volumen de suero necesario para lisar el 50% de los glóbulos rojos determina la unidad CH50. La AP-CH50 mide las rutas alternativa y terminal. El procedimiento es similar excepto en que se utilizan glóbulos rojos de conejo. La ruta alternativa resulta activada al añadir el suero de ensayo.

C1q y dos serina proteasas, C1r y C1s, forman el complejo C1, el primer componente de la ruta de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Para activar la cascada del complemento, C1q se une a por lo menos dos moléculas de IgG1 ó a una molécula de IgM, unidas a la diana antigénica (Ward E.S. y Ghetie V., Ther. Immunol. 2:77-94, 1995). Burton D.R. (Mol. Immunol. 22:161-206, 1985) indicó que la región de cadena pesada que comprendía los residuos aminoácidos 318 a 337 participaba en la fijación del complemento. Duncan A.R. y Winter G. (Nature 332:738-740, 1988) utilizando mutagénesis sitio-dirigida informó de que Glu318, Lys320 y Lys322 forman el sitio de unión a C1q. El papel de los residuos Glu318, Lys320 y Lys322 en la unión de C1q se confirmó a partir de la capacidad de un péptido sintético corto que contenía dichos residuos de inhibir la lisis mediada por el complemento.

La expresión "citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)" se refiere a la lisis de células endoteliales humanas que expresan OX40L por el anticuerpo según la invención en presencia del complemento. La CDC se mide preferentemente mediante el tratamiento de las células endoteliales humanas que expresan OX40L con un anticuerpo según la invención en presencia del complemento. Las células preferentemente se marcan con calceína. Se observa CDC en el caso de que el anticuerpo induzca la lisis de 20% o más de las células diana a una concentración de 30 mg/ml. Los inventores han encontrado que, para las propiedades de los anticuerpos según la invención, resulta esencial la unión reducida al factor del complemento C1q en un ensayo ELISA. En dicho ensayo en principio se recubre una placa ELISA con intervalos de concentración del anticuerpo, al que se añade C1q humano purificado o suero humano. La unión de C1q se detecta con un anticuerpo dirigido contra C1q, seguido de un conjugado marcado con peroxidasa. La detección de la unión (B_{max}, unión máxima) se mide como la densidad óptica a 405 nm (DO₄₀₅) para el sustrato de peroxidasa ABTS[®] (2,2'-azino-di[3-etilbenzotiazolín-6-sulfonato (6)]. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención se refiere a un anticuerpo caracterizado porque la no unión del anticuerpo al factor de complemento C1q se refiere a una medición en ensayo ELISA en la que la unión máxima (B_{max}) de C1q a un anticuerpo según la invención a una concentración de 10 mg/ml del anticuerpo es 20%

o menos de la Bmax observada con el anticuerpo LC.001, preferentemente 10% o menos .

5 Resulta adicionalmente preferente que un anticuerpo según la invención muestre una activación reducida del factor del complemento C3 en un ensayo ELISA. El ensayo se lleva a cabo de la misma manera que el ensayo de C1q. En dicho ensayo en principio una placa de ELISA se recubre con intervalos de concentración del anticuerpo, al que se añade suero humano. La unión de C3 se detecta con un anticuerpo dirigido contra C3 seguido de un conjugado marcado con peroxidasa. La detección de la unión (Bmax, unión máxima) se mide a partir de la densidad óptica a 405 nm (DO405) para el sustrato de peroxidasa ABTS®. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención se refiere a un anticuerpo, caracterizado porque la no unión del anticuerpo al factor del complemento C3 se refiere a una medición en ensayo ELISA en el que la unión máxima (Bmax) de C3 al anticuerpo a una concentración de 10 mg/ml del anticuerpo es 10% de la Bmax del anticuerpo LC.001, preferentemente 5% o menos.

15 La expresión "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)" se una función mediada por la unión de receptores de Fc y se refiere a la lisis de células diana que expresan OX40L según la invención en presencia de células efectoras. La ADCC se mide preferentemente mediante el tratamiento de una preparación de células eritroides expresantes de OX40L (por ejemplo células K562 que expresan OX40L humano recombinante) con un anticuerpo según la invención en presencia de células efectoras, tales como PBMC recién aisladas (células mononucleares de sangre periférica) o células efectoras purificadas a partir de capas leucocitarias, por ejemplo monocitos o células NK (asesinas naturales). Las células diana se marcan con ⁵¹Cr y posteriormente se incuban con los anticuerpos. Las células marcadas se incuban con células efectoras y el sobrenadante se analiza para el ⁵¹Cr liberado. Entre los controles se incluyen la incubación de las células endoteliales diana con células efectoras, aunque sin el anticuerpo. La capacidad de los anticuerpos de inducir las etapas iniciales que median en la ADCC fue investigada mediante la medición de su unión a células expresantes de receptores de Fcγ, tales como células que expresan recombinantemente FcγRI y/o RcγRIIA o células NK (que expresan esencialmente FcγRIIIA). Preferentemente se mide la unión a FcγR sobre las células NK.

30 Las funciones efectoras de unión a receptores de Fc pueden encontrarse mediadas por la interacción de la región Fc de un anticuerpo con receptores de Fc (FcR), los cuales son receptores especializados de superficie celular sobre las células hematopoyéticas. Los receptores de Fc pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y se ha demostrado que median tanto en la eliminación de los patógenos recubiertos de anticuerpos mediante fagocitosis de los complejos inmunológicos como en la lisis de los eritrocitos y diversas otras dianas celulares (por ejemplo células tumorales) recubiertas con el anticuerpo correspondiente, mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Van de Winkel, J.G., and Anderson, C.L., *J. Leukoc. Biol.* 49:511-524, 1991). Los FcR se definen a partir de su especificidad para isotipos de inmunoglobulina; los receptores de Fc para los anticuerpos IgG se denominan FcγR; para IgE, FcεR; para IgA, FcαR, etc. La unión de receptores de Fc se describe en, por ejemplo, Ravetch J.V. y Kinet J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991; Capel P.J. *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34, 1994; de Haas M. *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341, 1995; y Gessner J.E. *et al.*, *Ann. Hematol.* 76:231-248, 1998.

40 La reticulación de receptores para el dominio Fc de los anticuerpos IgG (FcγR) induce una amplia diversidad de funciones efectoras, incluyendo la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la liberación de mediadores inflamatorios, así como la eliminación de complejos inmunológicos y la regulación de la producción de anticuerpos. En el ser humano se han caracterizado tres clases de FcγR, que son:

- 45 - FcγRI (CD64) se une a IgG monomérico con alta afinidad y se expresa sobre macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos. La modificación en IgG de por lo menos uno de entre E233-G236, P238, D265, N297, A327 y P329 reduce la unión a FcγRI. Los residuos IgG2 en las posiciones 233 a 236, sustituidos en IgG1 e IgG4, redujeron la unión a FcγRI en 10³ veces y eliminaron la respuesta de monocitos humanos a los glóbulos rojos sensibilizados por anticuerpos (Armour K.L. *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 29:2613-2624, 1999).
- 50 - FcγRII (CD32) se une a IgG acomplejado con una afinidad intermedia a baja y se expresa ampliamente. Estos receptores pueden clasificarse en dos tipos importantes: FcγRIIA y FcγRIIB. Se encuentra FcγRIIA sobre muchas células que participan en la eliminación (por ejemplo macrófagos, monocitos y neutrófilos) y aparentemente activa el proceso de eliminación. FcγRIIB aparentemente desempeña un papel en procesos de inhibición y se encuentra sobre las células B, los macrófagos y sobre los mastocitos y eosinófilos. Sobre las células B aparentemente funciona suprimiendo la producción adicional de inmunoglobulinas y el cambio de isotipo a, por ejemplo, la clase IgE. Sobre los macrófagos, FcγRIIB actúa inhibiendo la fagocitosis mediada por FcγRIIA. Sobre los eosinófilos y los mastocitos, la forma b podría ayudar a suprimir la activación de estas células mediante la unión de IgE a su receptor independiente. La unión reducida a FcγRIIA se encuentra, por ejemplo, para la mutación IgG de por lo menos uno de entre E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292 y K414.
- 60 - FcγRIII (CD16) se une a IgG con una afinidad intermedia a baja y existe en forma de dos tipos. FcγRIIIA se

encuentra sobre las células NK, los macrófagos, los eosinófilos y algunos monocitos y células T y media en la ADCC. Fc γ RIIIB se expresa a nivel elevado sobre los neutrófilos. La unión reducida a Fc γ RIIIA se encuentra, por ejemplo, para la mutación de por lo menos uno de entre E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, Y296, V303, A327, K338 y D376.

5 El mapeado de los sitios de unión sobre la IgG1 humano para los receptores de Fc, los sitios de mutación anteriormente indicados y los métodos para medir la unión a Fc γ RI y a Fc γ RIIA se describen en Shields R.L. *et al.*, JBC 276:6591-6604, 2001.

10 La expresión "receptor de Fc" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a receptores de activación caracterizados por la presencia de una secuencia ITAM citoplasmática asociada al receptor (ver, por ejemplo, Ravetch J.V. y Bolland S., Annu. Rev. Immunol. 19:275-290, 2001). Dichos receptores son Fc γ RI, Fc γ RIIA y Fc γ RIIIA. Los anticuerpos según la invención preferentemente muestran una unión reducida a receptores de Fc γ , preferentemente a Fc γ RIIIA. Preferentemente, la expresión "sin unión a Fc γ R" se refiere a que a una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml, la unión de un anticuerpo según la invención a células NK es 10% o menos de la unión observada para el anticuerpo LC.001.

Aunque IgG4 muestra una unión reducida a FcR, los anticuerpos de otras subclases de IgG muestran un nivel de unión fuerte. Sin embargo, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (pérdida del carbohidrato de Fc), Pro329 y 234, 235, 236 y 237 Ile 253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434 e His435 son residuos que, en caso de alterarse, también proporcionan un nivel reducido de unión de FcR (Shields R.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001; Lund, J. *et al.*, FASEB J. 9:115-119, 1995; Morgan, A. *et al.*, Immunology 86:319-324, 1995; patente EP n° 0 307 434). Preferentemente, un anticuerpo según la invención de la subclase IgG1 ó IgG2 comprende la mutación PVA236, GLPSS331 y/o L234A/L235A. Un anticuerpo según la invención de la subclase IgG4 comprende preferentemente la mutación L235E. Son mutaciones de IgG4 adicionalmente preferentes, S228P ó L235E y S228P (ver la Tabla 1).

La expresión "unión a OX40L" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la unión del anticuerpo a OX40L humano en un ensayo BIAcore (Farmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia). Para confirmarlo adicionalmente, la unión a OX40L también puede determinarse en un ELISA en el que se utiliza OX40L purificado para recubrir las placas de microtitulación, o en un ensayo FACS en el que se use un anticuerpo marcado directa o indirectamente a células K562 que expresan OX40L.

En el ensayo BIAcore, el anticuerpo se une a una superficie y se mide la unión de OX40L mediante resonancia de plasmón superficial (SPR). La afinidad de la unión está definida por los términos k_a (constante de velocidad para la asociación del anticuerpo con el antígeno), k_d (constante de velocidad de disociación) y K_D (k_d/k_a). Los anticuerpos según la invención muestran una K_D de 10^{-8} o menos, preferentemente de entre aproximadamente 10^{-12} y 10^{-9} M (ver Ejemplos). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención se refiere a un anticuerpo tal como se ha indicado anteriormente, en el que el anticuerpo se une a OX40L con un valor de K_D inferior a 10^{-8} M en un ensayo BIAcore, preferentemente en el que el intervalo de K_D es de entre 10^{-12} y 10^{-9} M.

En el ELISA de unión específico para OX40L, se utiliza OX40L para recubrir placas de microtitulación y se detecta la unión del anticuerpo a OX40L con un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con HRP y las etapas habituales de una ELISA. Los valores de EC_{50} en dicho ensayo preferentemente se encuentran comprendidos en el intervalo de entre 3 y 8 nM.

La expresión "que inhibe la unión de OX40 a OX40L" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la unión del anticuerpo indicado en la presente invención a OX40L humano, inhibiendo de esta manera la interacción OX40/OX40L e inhibiendo de esta manera la transducción de señales inducida por OX40L.

Los anticuerpos de la presente invención inhiben la interacción hOX40L/OX40 preferentemente

i) al nivel *in vitro* mostrado por un ensayo ELISA mediante el bloqueo de la interacción de OX40L inmovilizado biotinilado con OX40 soluble por el anticuerpo a una concentración de recubrimiento (de la fase sólida) de 0,5 mg/ml de OX40L biotinilado con un valor de IC_{50} comprendido en el intervalo de entre 1 y 4 nM;

ii) al nivel *in vitro* mostrado por un ensayo BIAcore mediante el bloqueo de la interacción de OX40 inmovilizado con OX40 soluble (10 nM, preferentemente en forma de hOX40L-His) por el anticuerpo a una concentración de anticuerpo de entre 0,78 y 100 nM con un valor de IC_{50} comprendido en el intervalo de entre 1 y 10 nM.

iii) al nivel celular mostrado por un ensayo FACS en el que el anticuerpo bloquea la interacción de las células K562 que expresan OX40L (K562_OX40L) a una densidad de 2×10^5 células/muestra con OX40 con un valor de IC_{50} comprendido en el intervalo de entre 4 y 20 nM, iv) mediante un ensayo de transducción de señales de OX40 en el que el anticuerpo bloquea la transducción de señales de OX40 inducida por K562_OX40L en 3×10^4 células HeLa que expresan OX40 por cada muestra, lo que resulta en un bloqueo de la activación de NF κ B con un valor de IC_{50}

comprendido en el intervalo de entre 1 y 5 nM;

v) mediante un ensayo de activación de las células T, en el que el anticuerpo bloquea la activación de las células T activada por OX40L por K562_OX40L a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/muestra y a una concentración de PHA de 0,75 mg/ml con un valor de IC_{50} comprendido en el intervalo de entre 1 y 10 nM, y/o

5 vi) mediante un ensayo de activación de las células T, en el que el anticuerpo bloquea la activación de las células T inducida por OX40L por parte de las células B activadas o las células dendríticas (ensayo del tétanos) a una concentración de anticuerpo de 10 mg/ml, se obtuvo una inhibición de 40% a 60%.

10 Resultan preferentes los anticuerpos que muestran en un ensayo ELISA la inhibición mediante bloqueo de la interacción de OX40L inmovilizado por OX40 soluble a una concentración de recubrimiento de 0,5 mg/ml de OX40L con un valor de IC_{50} comprendido en el intervalo de entre 1 y 4 nM.

15 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, una realización preferente adicional de la presente invención se refiere a un anticuerpo, caracterizado porque dicho anticuerpo de esta manera inhibe la interacción OX40/OX40L y de esta manera inhibe la transducción de señales inducida por OX40L.

Resulta adicionalmente preferente que un anticuerpo según la invención no muestre unión no específica a TNF- α y a CD40L hasta una concentración de 500 nM de TNF- α o de CD40L.

20 Resulta adicionalmente preferente que un anticuerpo según la invención muestre una unión por lo menos 30 veces más baja a OX40L de ratón que a OX40L humano.

Resulta adicionalmente preferente que un anticuerpo según la invención a una concentración de 10 mg/ml no induzca la regulación negativa de la expresión de OX40L sobre las células HUVEC.

25 En una realización preferente adicional, los anticuerpos de la presente invención se caracterizan porque comprenden una combinación de dominio variable seleccionada independientemente de entre el grupo que consiste de las combinaciones:

30 a) el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo LC.001 definido por la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 y el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo LC.001 definido por SEC ID nº 2,

35 b) el dominio variable de cadena ligera (V_L) definido por la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 y el dominio variable de cadena pesada (V_H) definido por SEC ID nº 17,

c) el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 y el dominio variable de cadena pesada definido por SEC ID nº 20.

40 En una realización preferente adicional, los anticuerpos de la presente invención se caracterizan porque comprenden una región constante seleccionada independientemente de entre el grupo que consiste de:

k) la cadena ligera/kappa definida por la secuencia SEC ID nº 13,

45 l) la cadena pesada/gamma del isotipo IgG1 SEC ID nº 14 con una o más mutaciones seleccionadas de entre L234A y L235A, PVA236 ó GLPSS331,

m) la cadena pesada/gamma del isotipo IgG4 SEC ID nº 15,

n) la cadena pesada/gamma del isotipo IgG4 SEC ID nº 15 con la mutación S228P o las mutaciones S228P y L235E.

o) la cadena constante ligera incluida en SEC ID nº 61, 65 ó 69,

50 p) la cadena constante pesada incluida en SEC ID nº 58, 59, 60, 62, 63, 64, 66, 67 ó 68.

Resultan adicionalmente preferentes todas las combinaciones de cada combinación de dominio variable de anticuerpo a) - c) conjuntamente con una cadena gamma l), m), n) o p) y preferentemente con una cadena kappa k) u o). Resultan especialmente preferentes los anticuerpos que comprenden las cadenas variables del anticuerpo LC.001, cada una con cadena kappa definida por la secuencia SEC ID nº 13 ó la cadena constante ligera incluida en SEC ID nº 61, 65 ó 69 y la cadena pesada/gamma de isotipo IgG1 SEC ID nº 14 con las mutaciones L234A y L235A ó la cadena constante pesada incluida en SEC ID nº 59, nº 63 ó nº 67; anticuerpos que comprende las cadenas variables del anticuerpo LC.001, cada una con la cadena kappa definida por la secuencia SEC ID nº 13 ó la cadena constante pesada incluida en SEC ID nº 59, nº 63 ó nº 67 y la cadena pesada/gamma de isotipo IgG4 SEC ID nº 15 ó la cadena constante pesada incluida en SEC ID nº 60, nº 65 ó nº 68, la totalidad de las tres sin mutación S228P; anticuerpos que comprenden las cadenas variables del anticuerpo LC.001, cada una con la cadena kappa definida por la secuencia SEC ID nº 13 ó la cadena constante ligera incluida en SEC ID nº 61, nº 65 ó nº 69 y la cadena pesada/gamma de isotipo IgG4 SEC ID nº 15 con la mutación S228P ó la cadena constante pesada incluida en SEC ID nº 60, nº 64 ó nº 68.

Preferentemente, los anticuerpos comprenden la CDR variable de cadena ligera de secuencia de aminoácidos SEC ID n° 1 y la CDR variable de cadena pesada o la CDR variable de cadena ligera de secuencia de aminoácidos y la CDR variable de cadena pesada.

5 Los anticuerpos preferentes se caracterizan porque los anticuerpos son de la subclase IgG4 humana o de otra subclase humana (preferentemente IgG1), comprendiendo por lo menos una mutación de aminoácido causante de la no unión al factor del complemento C1q y/o la pérdida de la unión de FCR. Dichos anticuerpos variantes preferentes comprenden, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos SEC ID n° 14 con las mutaciones L234A y L235A ó la SEC ID n° 15 con o sin mutación S228P.

10 Los anticuerpos preferentes según la invención son los anticuerpos definidos como IgG1v1 (PHA-236; GLPSS331 especificado por E233P; L234V; L235A; delta G236; A327G; A330S; P331S), IgG1v2 (L234A; L235A) e IgG4v1 (S228P; L235E) e IgG4x (S228P)

15 La línea celular de hibridoma hu-mAb<hOX40L>LC.001 según la invención se ha depositado, bajo el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania, el 27 de julio de 2004 bajo el n° de depósito DSM ACC 2672.

20 Las líneas celulares de hibridoma hu-mAb<hOX40L>LC.005 (DSM ACC 2685), hu-mAb<hOX40L>LC.010 (DSM ACC 2686), hu-mAb<hOX40L>LC.019, hu-mAb<hOX40L>LC.029 (DSM ACC 2688) y hu-mAb<hOX40L>LC.033 (DSM ACC 2689) según la invención se depositaron, bajo el Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes, en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Alemania, el 2 de septiembre de 2004.

25 Los anticuerpos obtenibles a partir de dichas líneas celulares son realizaciones preferentes de la invención y resultan especialmente útiles como sustancias intermedias para la generación de anticuerpos según la invención que no se unen al factor del complemento C1q y/o que no se unen a receptores de Fcy humano.

30 Son realizaciones preferentes adicionales de la invención los anticuerpos anti-OX40L aislados que se unen a OX40L y que se unen al mismo epitopo de OX40L.

35 Una realización adicional de la invención es un método para la producción de un anticuerpo contra OX40L que no se une al factor del complemento humano C1q y/o a receptores de Fcy humanos, caracterizado porque la secuencia de un ácido nucleico codificante de la cadena pesada de un anticuerpo de unión a OX40L con un valor de K_D inferior a 10^{-8} M se modifica de manera que dicho anticuerpo modificado no se una al factor del complemento C1q y/o a receptores de Fcy humano sobre las células NK, insertando dicho ácido nucleico modificado y el ácido nucleico codificante de la cadena ligera de dicho anticuerpo, en un vector de expresión, e insertando este vector en una célula huésped procariontica o eucariótica, expresando la proteína codificada y recuperándola a partir de la célula huésped o del sobrenadante.

40 Una realización adicional de la invención es un método para la producción de un anticuerpo según la invención que no se une al factor del complemento C1q y/o que no se une al receptor de Fcy humano, caracterizado porque un anticuerpo obtenible a partir de una de dichas líneas celulares se modifica mediante "cambio de clase", es decir, el cambio o mutación de la parte Fc (por ejemplo de IgG1 a IgG4 y/o la mutación IgG1/IgG4), preferentemente definida como IgG1v1 (PVA-236; GLPSS331 especificado por E233P; L234V; L235A; delta G236; A327G; A330S; P331S), IgG1v2 (L234A, L235A) e IgG4v1 (S228P, L235E) e IgG4x (S228P).

45 En una realización preferente adicional, dichos anticuerpos comprenden además fragmentos de anticuerpo seleccionados de entre el grupo que consiste de Fab, F(ab')₂ y fragmentos de cadena sencilla.

50 Por lo tanto, un anticuerpo anti-OX40L "variante" se refiere en la presente memoria a una molécula que difiere en su secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de anticuerpo anti-OX40L "parental" en virtud de la adición, delección y/o sustitución de uno o más residuos aminoácidos en la secuencia del anticuerpo parental. En la realización preferente, la variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones constantes o variables del anticuerpo parental, preferentemente en la región constante. Por ejemplo, la variante puede comprender por lo menos uno, por ejemplo entre aproximadamente uno y aproximadamente diez, y preferentemente entre aproximadamente dos y aproximadamente cinco, sustituciones en una o más regiones variables del anticuerpo parental. Habitualmente, la variante presentará una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos 90% respecto a las secuencias de dominio constante y/o variable del anticuerpo parental, más preferentemente de por lo menos 95%, y todavía más preferentemente de por lo menos 99%.

También se da a conocer un método para modificar la secuencia de aminoácidos inicial de una CDR de cadena pesada del anticuerpo parental seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID n° 21 a 38 y/o una CDR de cadena ligera de anticuerpo seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID n° 44, n° 46 y n° 52, caracterizada porque proporciona un ácido nucleico codificante de dicha secuencia inicial de aminoácidos, modificando dicho ácido nucleico en un aminoácido de la CDR1 de cadena pesada, en 1-2 aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada, en 1-2 aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada, en 1-3 aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera, en 1-3 aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera y/o en 1-3 aminoácidos de la CDR3 de cadena ligera, expresándose dicha secuencia de aminoácidos de CDR modificada en una estructura de anticuerpo, midiendo si dicho anticuerpo se une a OX40L con una K_D inferior a 10^{-8} M y seleccionando dicha CDR modificada en el caso de que el anticuerpo se una a OX40L con una K_D inferior a 10^{-8} M. Preferentemente, dichas modificaciones son modificaciones de secuencia conservadoras.

La identidad u homología con respecto a la secuencia se define en la presente memoria como el porcentaje de residuos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos del anticuerpo parental, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas en la secuencia del anticuerpo debe interpretarse que afecta a la identidad o a la homología de secuencia. La variante conserva la capacidad de unirse a OX40L humano y preferentemente presenta propiedades que son superiores a las del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante puede presentar menos efectos secundarios durante el tratamiento de la artritis reumatoide y el asma ya que OX40L no sólo se expresa transitoriamente sobre células B, células dendríticas y macrófagos, sino también sobre las células endoteliales (Kotani A. *et al.*, Immunol. Lett. 84:1-7, 2002), células de músculo liso de las vías respiratorias (MSVR) (Burgess J.K., J. Allergy Clin. Immunol 113:683-689, 2004) y células microgliales (Weinberg A.D. *et al.*, J. Immunol. 162:1818-1826, 1999). La unión de los anticuerpos contra OX40L a las células endoteliales, a MSVR y a células microgliales puede resultar en daños celulares; a células endoteliales: fugas vasculares, a células MSVR: destrucción de pulmón; a células microgliales: daños a la microglia.

El anticuerpo "parental" en la presente memoria es uno codificado por una secuencia de aminoácidos utilizada para la preparación de la variante. Preferentemente, el anticuerpo parental presenta una región marco humana y, en caso de encontrarse presente, una o más regiones constantes de anticuerpo humano. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano, preferentemente del tipo IgG1.

Los anticuerpos según la invención incluyen, además, anticuerpos que presentan "modificaciones conservadoras de la secuencia" (anticuerpos variantes), modificaciones de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos que no afectan o alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo según la invención. Pueden introducirse modificaciones mediante técnicas estándares conocidas de la técnica, tales como la mutagénesis dirigida a sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Entre las sustituciones conservadoras de aminoácidos se incluyen aquéllas en las que se sustituye un residuo aminoácido por un residuo aminoácido que presenta una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica las familias de residuos aminoácidos que presentan cadenas laterales similares. Entre estas familias se incluyen los aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). De esta manera, un residuo aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-OX40L humano puede sustituirse preferentemente por otro residuo aminoácido de la misma familia de cadena lateral.

Pueden llevarse a cabo sustituciones de aminoácidos mediante mutagénesis basándose en el modelaje molecular, tal como describen Riechmann L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1988, y Queen C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989.

La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo, caracterizado porque la secuencia de un primer ácido nucleico codificante de la cadena pesada de un anticuerpo de unión a OX40L con un valor de K_D inferior a 10^{-8} M se modifica de manera que dicho anticuerpo modificado no se una al factor del complemento C1q y/o a receptores de Fc γ humano sobre las células NK, insertando dicho primer ácido nucleico modificado y un segundo ácido nucleico codificante de la cadena ligera de dicho anticuerpo, en un vector de expresión, e insertando dicho vector en una célula huésped procariótica o eucariótica, cultivando dicha célula huésped bajo condiciones que permitan la síntesis de dicho anticuerpo y la recuperación del mismo a partir de dicho cultivo.

La invención comprende además un método para la producción de un anticuerpo según la invención y comprende una parte Fc derivada de origen humano, comprendiendo dicho método las etapas de: a) transformar una célula huésped con una primera secuencia de ácidos nucleicos codificante de una cadena ligera de un anticuerpo humano

parental según la invención y una segunda secuencia de ADN codificante de una cadena pesada de dicho anticuerpo humano parental, en el que la parte Fc se modifica en que dicha parte Fc no se une al factor del complemento C1q y/o a receptores de Fc, b) expresar dicha primera y segunda secuencias de ADN de manera que se produzcan dichas cadenas pesada y ligera de anticuerpo, y c) recuperar dicho anticuerpo a partir de la célula huésped o del cultivo de células huésped.

La presente invención comprende además moléculas de ácidos nucleicos codificantes de un anticuerpo indicado anteriormente, comprendiendo los vectores correspondientes dichos ácidos nucleicos y la célula huésped correspondiente para dichos vectores. La invención comprende un método para la preparación de los anticuerpos, que comprende cultivar las células huésped correspondientes bajo condiciones que permitan la síntesis de dichas moléculas de anticuerpo y recuperar dichos anticuerpos a partir de dicho cultivo, por ejemplo mediante la expresión de un ácido nucleico codificante de una cadena pesada y un ácido nucleico codificante de una cadena ligera en una célula huésped procariótica o eucariótica y recuperar dicho polipéptido a partir de dicha célula.

Se encuentran contemplados los usos diagnósticos y terapéuticos del anticuerpo. En una aplicación diagnóstica, la invención proporciona un método para determinar la presencia de la proteína OX40L, que comprende exponer una muestra que se sospecha que contiene OX40L al anticuerpo anti-OX40L y determinar la unión del anticuerpo a la muestra. La proteína OX40L puede insertarse en la membrana celular de las células expresantes de OX40L mediante su dominio transmembranal o puede encontrarse en forma de dominio extracelular soluble en líquidos corporales liberados por mecanismos tales como la escisión o la liberación proteolítica. Para este uso, la invención proporciona un kit que comprende el anticuerpo e instrucciones para utilizar el anticuerpo para detectar la proteína OX40L.

Los anticuerpos de la presente invención resultan útiles para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades inflamatorias en un mamífero, preferentemente en un paciente que se sospecha que presenta o que sufre dicha enfermedad. Entre dichas enfermedades se incluyen reacciones alérgicas tales como el asma. Otras aplicaciones son el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, incluyendo la artritis reumatoide.

La invención proporciona además un método para tratar un mamífero que sufre de los trastornos inflamatorios anteriormente indicados, especialmente de asma y artritis reumatoide.

Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para el tratamiento de asma persistente severa en pacientes cuyos síntomas no son adecuadamente controlados con corticoesteroides inhalados. La población de pacientes incluye adultos y adolescentes (12 años de edad y mayores) con asma persistente severa inadecuadamente controlada. El anticuerpo se administra preferentemente por vía subcutánea una o dos veces al mes. El criterio de valoración principal preferentemente es la reducción de las exacerbaciones agudas. Entre otros criterios de valoración se incluyen el flujo máximo, los síntomas diurnos de asma, las interrupciones del sueño nocturno, la calidad de vida, las visitas a una sala de emergencias, el número de días sin asma, la utilización de agonistas beta-2, la reducción o escalonado de los esteroides y el efecto sobre la hiperreactividad.

Resulta adicionalmente preferente utilizar los anticuerpos según la invención para la monoterapia o en combinación con metotrexato u otros FAME (fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad) para el tratamiento de adultos con artritis reumatoide activa moderada a severa. Se administra en forma de inyección subcutánea cada 2 ó 4 semanas. Es terapia crónica en pacientes en los que han fracasado uno o más FAME. Entre los criterios de valoración se incluyen la reducción de los signos y síntomas y la inhibición de la progresión del daño estructural en pacientes adultos con artritis reumatoide activa. Prevención de discapacidad, mejora de los signos y síntomas medida siguiendo criterios de la ACR (ACR20 >60%, ACR50 > 35%, ACR70 > 15%; índice del American College of Rheumatology; www.rheumatology.com).

Una realización adicional de la invención es la utilización de los anticuerpos según la invención para la preparación de medicamentos destinados al tratamiento de dichas enfermedades.

La invención se refiere además a la utilización de los anticuerpos definidos anteriormente para la preparación de una composición farmacéutica y comprende una composición farmacéutica que contiene un anticuerpo según la invención en una cantidad farmacéuticamente efectiva, opcionalmente con un tampón y/o un adyuvante útil para la formulación de anticuerpos con fines farmacéuticos.

La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden dichos anticuerpos en un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica puede incluirse en un artículo manufacturado o kit.

Los anticuerpos según la invención preferentemente se producen por medios recombinantes. Dichos métodos son ampliamente conocidos del estado de la técnica y comprenden la expresión de proteínas en células procarióticas y

eucarióticas con el posterior aislamiento del polipéptido anticuerpo y habitualmente la purificación hasta una pureza farmacéuticamente aceptable. Para la expresión de proteínas, se insertan ácidos nucleicos codificantes de cadenas ligeras y pesadas o fragmentos de las mismas en vectores de expresión mediante métodos estándares. La expresión se lleva a cabo en células huésped procaríóticas o eucarióticas apropiadas, tales como células CHO, células NS0, células SP2/0, células HEK293, células COS, levaduras o células de *E. coli*, y el anticuerpo se recupera de las células (del sobrenadante o de las células tras la lisis).

La producción recombinante de anticuerpos es bien conocida del estado de la técnica y se describe, por ejemplo, en los artículos de revisión de Makrides S.C., *Protein Expr. Purif.* 17:183-202, 1999; Geisse S. *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 8:271-282, 1996; Kaufman R.J., *Mol. Biotechnol.* 16:151-161, 2000; Werner R.G. *et al.*, *Arzneimittelforschung* 48:870-880, 1998.

Los anticuerpos pueden encontrarse presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Se lleva a cabo la purificación con el fin de eliminar otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas estándares, incluyendo el tratamiento alcalino/SDS, la cromatografía de columna y otras bien conocidas de la técnica. Ver Ausubel F. *et al.*, editor, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987.

La expresión en células NS0 se describe en, por ejemplo, Barnes L.M. *et al.*, *Cytotechnology* 32:109-123, 2000, y en Barnes, L.M. *et al.*, *Biotech. Bioeng.* 73:261-270, 2001. La expresión transitoria se describe en, por ejemplo, Durocher, Y. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 30:E9, 2002. La clonación de dominios variables se describe en Orlandi, R. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3833-3837, 1989; Carter, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285-4289, 1992, y en Norderhaug, L. *et al.*, *J. Immunol. Methods* 204:77-87, 1997. Un sistema de expresión transitoria preferente (HEK293) se describe en Schlaeger, E.-J. y Christensen, K., *Cytotechnology* 30:71-83, 1999, y en Schlaeger, E.-J., *J. Immunol. Methods* 194:191-199, 1996.

Entre las secuencias de control que resultan adecuadas para los procariotas se incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión ribosómica. Es conocido que las células eucarióticas utilizan promotores, intensificadores y señales de poliadenilación.

Un ácido nucleico se encuentra "operablemente ligado" en el caso de que se sitúe en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretorio se encuentra operablemente ligado a ADN para un polipéptido en el caso de que se exprese como preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que afecte a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante en el caso de que se sitúe de manera que facilite la traducción. Generalmente, la expresión "operablemente ligado" se refiere a que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretorio, contiguas y en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no son necesariamente contiguos. La unión se lleva a cabo mediante ligación en sitios de restricción apropiados. En el caso de que dichos sitios no existan, se utilizan adaptadores oligonucleótidos sintéticos o *líinker* según la práctica convencional.

Se preparan convenientemente anticuerpos monoclonales a partir del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. El ADN y ARN codificante de los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia fácilmente mediante procedimientos convencionales. Las células de hibridoma pueden servir como fuente de dicho ADN y ARN. Tras el aislamiento, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que seguidamente se transfectan en células huésped, tales como células HEK 293, células CHO o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales recombinantes en las células huésped.

Las variantes (o mutantes) de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo de OX40L humano se preparan mediante la introducción de cambios nucleótidos apropiados en el ADN del anticuerpo, o mediante síntesis de nucleótidos. Sin embargo, estas modificaciones únicamente pueden llevarse a cabo bajo condiciones muy limitadas, por ejemplo tal como se ha indicado anteriormente. Por ejemplo, las modificaciones no alteran las características anteriormente indicadas del anticuerpo, tales como el isotipo de IgG y la unión de epítomos, pero pueden mejorar el rendimiento de la producción recombinante, la estabilidad de la proteína o facilitar la purificación.

También puede sustituirse cualquier residuo cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo anti-OX40L, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar entrecruzamientos aberrantes. A la inversa, pueden añadirse uno o más enlaces de cisteína al anticuerpo para mejorar su estabilidad (particularmente en el caso de que el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo, tal como un

fragmento Fv).

Las moléculas de ácido nucleico codificantes de variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-OX40L se preparan mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Entre estos métodos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de las variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), la mutagénesis mediante PCR y la mutagénesis por inserción de casete de una variante previamente preparada o de una versión no variante de anticuerpo anti-OX40L humanizado.

La invención se refiere además a inmunoconjugados que comprenden el anticuerpo según la invención conjugado con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), un isótopo radioactivo (por ejemplo un conjugado radioactivo). Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico se preparan utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncional, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendianina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolieno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta E.S. *et al.*, Science 238:1098-1104, 1987. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén-triaminapentaacético marcado (MX-DT-PA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Ver el documento WO n° 94/11026.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo comprende unir el anticuerpo a uno de entre una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera indicada en las patentes US n° 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 ó 4.179.337.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona células B aisladas de un animal no humano transgénico, por ejemplo de un ratón transgénico, que expresa los anticuerpos anti-OX40L humanos (por ejemplo los anticuerpos parentales producidos por una línea celular seleccionada de entre el grupo que consiste de células de hibridoma productoras de anticuerpos según la invención). Preferentemente, las células B aisladas se obtienen de un animal no humano transgénico, por ejemplo de un ratón transgénico, que ha sido inmunizado con una forma purificada o recombinante de antígeno OX40L y/o células que expresan OX40L. Preferentemente, el animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, presenta un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana codificante de la totalidad o de una parte de un anticuerpo de la invención. Las células B aisladas seguidamente se immortalizan para proporcionar una fuente (por ejemplo un hibridoma) de anticuerpos anti-OX40L humanos. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención proporciona además un hibridoma capaz de producir anticuerpos monoclonales humanos según la invención. En una realización, el hibridoma incluye una célula B obtenida de un animal no humano transgénico, por ejemplo de un ratón transgénico, que presenta un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana codificantes de la totalidad o de una parte de un anticuerpo de la invención, fusionados con una célula immortalizada.

En una realización particular, el animal no humano transgénico es un ratón transgénico que presenta un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana codificante de la totalidad o de una parte de un anticuerpo de la invención. El animal no humano transgénico puede inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno OX40L y/o células que expresan OX40L. Preferentemente, el animal no humano transgénico, por ejemplo el ratón transgénico, es capaz de producir isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra OX40L.

Los anticuerpos monoclonales humanos según la invención pueden producirse mediante la inmunización de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, que presenta un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera humana codificantes de la totalidad o de una parte de un anticuerpo de la invención, con una preparación purificada o enriquecida en antígeno OX40L y/o en células que expresan OX40L. A continuación, se obtienen las células B (por ejemplo las células B esplénicas) del animal y se fusionan con células de mieloma para formar células de hibridoma inmortales que secretan anticuerpos monoclonales humano contra OX40L.

En una realización preferente, pueden generarse anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra OX40L utilizando ratones transgénicos portadores de partes del sistema inmunológico humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos, denominados en la presente memoria ratones "HumAb", contienen miniloci genéticos de inmunoglobulina humana que codifican genes no reorganizados de inmunoglobulina humana que incluyen la cadena pesada (μ y γ) y ligera κ (genes de región constante), conjuntamente con mutaciones dirigidas

que inactivan la κ endógena y los loci de cadena κ (Lonberg N. *et al.*, Nature 368:856-859, 1994). De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los ratones muestran una expresión reducida de IgM o K de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadenas pesada y ligera humanas introducidas experimentan cambio de clase y mutación somática, generando anticuerpos monoclonales IgG humanos de elevada afinidad (Lonberg, N., *et al.*, Nature 368:856-859, 1994; revisión en Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101, 1994; Lonberg, N., and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25:65-93, 1995, y Harding, F. y Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci. 764:536-546, 1995). La preparación de los ratones HumAb se describe en Taylor L. *et al.*, Nucleic Acids Res. 20:6287-6295, 1992; Chen J. *et al.*, Int. Immunol. 5:647-656, 1993; Tuailon N. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724, 1993; Choi T.K. *et al.*, Nat. Genet. 4:117-123, 1993; Chen J. *et al.*, EMBO J. 12:821-830, 1993; Tuailon N. *et al.*, J. Immunol. 152:2912-2920, 1994; Lonberg N. *et al.*, Nature 368:856-859, 1994; Lonberg N., Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101, 1994; Taylor L. *et al.*, Int. Immunol. 6:579-591, 1994; Lonberg N. y Huszar D., Intern. Rev. Immunol. 25:65-93, 1995; Harding F. y Lonberg N., Ann. N. Acad. Sci. 764:536-546, 1995; Fishwild D.M. *et al.*, Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996. Ver adicionalmente las patentes US n° 5.545.806, n° 5.569.825, n° 5.625.126, n° 5.633.425, n° 5.789.650, n° 5.877.397, n° 5.661.016, n° 5.814.318, n° 5.874.299, n° 5.545.807, n° 5.770.429; documentos WO n° 98/24884, n° 94/25585, n° 93/1227, n° 92/22645 y n° 92/03918.

Para generar anticuerpos monoclonales totalmente humanos contra OX40L, los ratones HumAb pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno OX40L y/o células que expresan OX40L según el método general, tal como describen Lonberg N. *et al.*, Nature 368:856-859, 1994; Fishwild D.M. *et al.*, Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996, y documento WO n° 98/24884. Preferentemente, los ratones serán de 6 a 16 semanas de edad en la primera inmunización. Por ejemplo, puede utilizarse una preparación purificada o enriquecida en antígeno OX40L soluble (por ejemplo purificada a partir de células expresantes de OX40L) acoplado con KLH o en PBS para inmunizar los ratones HumAb por vía intraperitoneal. Lo anterior puede combinarse con la inmunización alternativa con la proteína OX40L aislada y con células que expresan OX40L, por ejemplo una línea celular tumoral, para estimular respuestas inmunológicas. La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos HumAb responden mejor al inmunizarlos inicialmente por vía intraperitoneal (i.p.) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones i.p. cada dos semanas (por ejemplo hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Puede realizarse un seguimiento de la respuesta inmunológica durante el curso del protocolo de inmunización obteniendo las muestras de plasma de sangrados retroorbitales. El plasma puede cribarse mediante ELISA, y pueden utilizarse ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina anti-OX40L humana para la inmortalización de las células B correspondientes. Los ratones pueden recibir refuerzos intravenosos con antígeno 3 a 4 días antes del sacrificio y tras la extirpación del bazo y los nódulos linfáticos. Se inmunizan varios ratones para cada antígeno. Por ejemplo, puede inmunizarse un total de doce ratones HumAb de las cepas HCo7 y HCo12.

Los ratones HCo7 presentan una interrupción JKD en sus genes de cadena ligera endógena (κ) (tal como se describe en Chen J. *et al.*, EMBO J. 12:821-830, 1993), una interrupción CMD en sus genes de cadena pesada endógena (tal como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO n° 01/14424), un transgén KCo5 de cadena ligera κ humana (tal como se describe en Fishwild D.M. *et al.*, Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996) y un transgén HCo7 de cadena pesada humana (tal como se describe en la patente US n° 5.770.429).

Los ratones HCo12 presentan una interrupción JKD en sus genes de cadena ligera endógena (κ) (tal como se describe en Chen J. *et al.*, EMBO J. 12:821-830, 1993), una interrupción CMD en sus genes de cadena pesada endógena (tal como se describe en el Ejemplo 1 del documento WO n° 01/14424), un transgén KCo5 de cadena ligera κ humana (tal como se describe en Fishwild D.M. *et al.*, Nat. Biotechnol. 14:845-851, 1996) y un transgén HCo12 de cadena pesada humana (tal como se describe en el Ejemplo 2 del documento WO n° 01/14424). Los linfocitos de ratón pueden aislarse y fusionarse con una línea celular de mieloma de ratón utilizando PEG basándose en protocolos estándares para generar hibridomas. A continuación, los hibridomas resultantes se criban para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, se fusionan suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos y derivados de nódulos linfáticos procedentes de ratones inmunizados, con un número un sexto menor de células de mieloma de ratón no secretoras SP 2/0 (ATCC n° CRL 1581) con PEG al 50%. Las células se siembran a razón de aproximadamente 2×10^5 en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación durante aproximadamente dos semanas en medio selectivo.

A continuación se cribaron los pocillos individuales mediante ELISA para anticuerpos monoclonales IgM e IgG anti-OX40L humanos. Tras producirse el crecimiento extensivo del hibridoma, se analiza el medio, habitualmente tras 10 a 14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se siembran en placa nuevamente, se criban nuevamente y, en caso de que todavía sean positivos para IgG humana, pueden subclonarse anticuerpos monoclonales anti-OX40L por lo menos dos veces mediante dilución limitante. A continuación, se cultivan los subclones estables para producir anticuerpos en medio de cultivo de tejidos para la caracterización.

El árbol de ensayo está compuesto principalmente de un ensayo no específico en IgG ("ELISA de IgG") seguido de un ELISA específico y un ensayo de FACS aparente para la determinación de la unión de antígeno a proteína

OX40L purificada o a células expresantes de OX40L. La etapa siguiente comprende ensayos funcionales en los que se determina la competición del anticuerpo anti-OX40L con su pareja de interacción natural, por ejemplo OX40 purificado soluble para OX40L o OX40L purificado expresado sobre las células, por ejemplo en ELISA o FACS de competición. La etapa siguiente comprende un ensayo funcional en el que se determina la capacidad de bloquear la transducción de señales de OX40 del anticuerpo anti-OX40L, por ejemplo la activación de NFκB ("ensayo de NFκB"). La etapa siguiente comprende ensayos funcionales en los que se determina la capacidad de activar las células T del anticuerpo anti-OX40L ("ensayo de activación de las células T" y "ensayo TT").

Debido a que las secuencias de CDR son responsables de las interacciones de anticuerpo-antígeno, resulta posible expresar anticuerpos recombinantes según la invención mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen las secuencias de CDR según la invención en secuencias de marco de un anticuerpo humano diferente (ver, por ejemplo, Riechmann L. *et al.*, Nature 332:323-327, 1998; Jones P. *et al.*, Nature 321:522-525, 1986, y Queen C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033, 1989). Dichas secuencias de marco pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias génicas de anticuerpo humano de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal difieren de las secuencias génicas de los anticuerpos maduros en que no incluyen genes variables ensamblados por completo, los cuales se forman mediante unión de V(D)J durante la maduración de las células B. Las secuencias génicas de línea germinal también difieren de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad en sitios individuales situados uniformemente a lo largo de la región variable.

La invención comprende además la utilización de un anticuerpo según la invención para el diagnóstico de OX40L *in vitro*, preferentemente mediante un ensayo inmunológico que determina la unión entre OX40L (soluble o unido a membrana) de una muestra y el anticuerpo según la invención.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo monoclonal o una combinación de anticuerpos monoclonales humanos, o la porción ligante de antígeno del mismo, de la presente invención, formulados conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable. Más concretamente, la composición es una composición farmacéutica o diagnóstica, y todavía más concretamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo tal como se ha definido anteriormente y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición debe ser estéril y líquida en grado suficiente para que la composición resulte administrable mediante jeringa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y la totalidad de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador resulta adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo mediante inyección o infusión). Preferentemente, dicho portador es una solución acuosa de pH tamponado (por ejemplo acetato, citrato, fosfato o histidina), preferentemente isotónica, preferentemente que contiene además una sal inorgánica, azúcar, poliol y/o un surfactante. Los portadores farmacéuticamente aceptables también son algunos tales como los indicados en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A., editor, 1980.

La concentración de anticuerpos es preferentemente de entre 0,1 y 50 mg/ml. Preferentemente, el valor de pH de la solución tamponada se encuentra comprendida entre 4,0 y 8,0 a una concentración de tampón de entre 1 y 200 mM. Las sales preferentes son cloruro sódico y/o fosfato sódico en el intervalo de entre 1 y 200 mM. Los azúcares preferentes son sacarosa y/o trehalosa en el intervalo de entre 1% y 15% (p/v). Los polioles preferentes son glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y/o similares en el intervalo de entre 1% y 15% (p/v). El surfactante preferentemente es un polisorbato (por ejemplo polisorbato 20 ó 80) y/o poloxámero en el intervalo de entre 0,001% y 0,5% (p/v). Una composición farmacéutica preferente contiene anticuerpo a una concentración de entre 0,1 y 50 mg/ml y solución salina tamponada con fosfato 1 mM a 200 mM, pH 4,0 a 8,0.

Puede administrarse una composición de la presente invención mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica en un paciente que necesita de la misma. Tal como apreciará el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados.

Entre los excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen soluciones acuosas estériles o polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocida de la técnica.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitarse a las mismas, las inyecciones e infusiones intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal,

subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal

5 Los niveles reales de las dosis de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden modificarse de manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que resulte efectiva para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin resultar tóxicos para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente invención utilizadas, o el éster, sal o amida de las mismas, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción del compuesto particular utilizado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o

10 materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares utilizadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado general de salud y la historia médica anterior del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos de las técnicas médicas. Una dosis semanal típica puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

15 Los ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse de la invención.

20 Breve descripción de los dibujos

- Fig. 1a: muestra un "ELISA de unión" para TAG-34, LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033.
- Fig. 1b: muestra un "ELISA de bloqueo" + datos de IC₅₀ para TAG-34, LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033.
- Fig. 2: muestra "FACS de bloqueo" para TAG-34, LC.001, LC.005.
- Fig. 3: muestra un "ensayo de NFκB" para TAG-34, LC.001, LC.019 y LC.024 (anticuerpo no ligante).
- Figs. 4 y 5: muestra un "ensayo de activación de células T" y valores de IC₅₀ para TAG-34, LC.001 y LC.005 (fig. 4: liberación de IL-2, fig. 5: Inhibición).
- Fig. 6: muestra datos de "ensayo TT" para TAG-34, LC.001 y LC.033.
- Fig. 7: muestra la reactividad cruzada de los anticuerpos de la invención con OX40L de ratón. A) control de expresión de hOX40L sobre células transfectadas y WT, B) unión de los anticuerpos a células K562 expresantes de hOX40L, C) control de la expresión de mOX40L sobre células transfectadas y WT, D) unión de los anticuerpos a células K562 expresantes de mOX40L, y E) unión de los anticuerpos a células K562 WT (n=3).
- Fig. 8: muestra la capacidad de los anticuerpos de la invención de unirse a C1q (n=3).
- Fig. 9: muestra la capacidad de los anticuerpos de la invención de activar C3c (n=3).
- Fig.10: muestra la capacidad de los anticuerpos de la invención de unirse a FcγRI (n=4), FcγRIIIa (n=4) y FcγRIIb (n=4).
- Fig. 11: muestra la capacidad de los anticuerpos de la invención de unirse a FcγRIIIa (CD16) sobre las células NK (media ± SEM de 6 donantes).
- Fig.12: transferencia western; carriles 1, 4, 7: marcador; carriles 2, 5, 8: 100 ng de OX40L; carriles 3, 6, 9: 40 ng de OX40L.

25 Descripción del listado de secuencias

- SEC ID nº 1 cadena ligera kappa, región variable de LC.001
- SEC ID nº 2 región variable de cadena pesada γ de LC.001
- SEC ID nº 3 cadena ligera kappa, región variable de LC.005
- SEC ID nº 4 región variable de cadena pesada γ de LC.005
- 30 SEC ID nº 5 cadena ligera kappa, región variable de LC.010
- SEC ID nº 6 región variable de cadena pesada γ de LC.010
- SEC ID nº 7 cadena ligera kappa, región variable de LC.029
- SEC ID nº 8 región variable de cadena pesada γ de LC.029
- SEC ID nº 9 cadena ligera kappa, región variable de LC.019
- 35 SEC ID nº 10 región variable de cadena pesada γ de LC.019
- SEC ID nº 11 cadena ligera kappa, región variable de LC.033
- SEC ID nº 12 región variable de cadena pesada γ de LC.033
- SEC ID nº 13 región constante de cadena ligera kappa
- SEC ID nº 14 región constante de cadena pesada γ1
- 40 SEC ID nº 15 región constante de cadena pesada γ4

	SEC ID nº 16	cadena ligera kappa, región variable mutante de LC.033
	SEC ID nº 1	cadena ligera kappa, región variable de LC.059
	SEC ID nº 7	región variable de cadena pesada γ de LC.059
	SEC ID nº 18	cadena ligera kappa, región variable de LC.060
5	SEC ID nº 19	región variable de cadena pesada γ de LC.060
	SEC ID nº 1	cadena ligera kappa, región variable de LC.063
	SEC ID nº 20	región variable de cadena pesada γ de LC.063
	SEC ID nº 21-57	secuencias de CDR
	SEC ID nº 58	cadena pesada γ de LC.001 (de tipo IgG1 humana)
10	SEC ID nº 59	cadena pesada de LC.001 (mutante L234A, L235A de IgG1 humana)
	SEC ID nº 60	cadena pesada γ de LC.001 (mutante S228P de IgG4 humana)
	SEC ID nº 61	cadena ligera kappa de LC.001
	SEC ID nº 62	cadena pesada γ de LC.005 (de tipo IgG1 humana)
	SEC ID nº 63	cadena pesada γ de LC.005 (mutante de IgG1 humana L234A, L235A)
15	SEC ID nº 64	cadena pesada γ de LC.005 (mutante de IgG4 humana S228P)
	SEC ID nº 65	cadena ligera kappa de LC.005
	SEC ID nº 66	cadena pesada γ de LC.060 (de tipo IgG1 humana)
	SEC ID nº 67	cadena pesada γ de LC.060 (mutante de IgG1 humana L234A, L235A)
	SEC ID nº 68	cadena pesada γ de LC.060 (mutante de IgG4 humana S228P)
20	SEC ID nº 69	cadena ligera kappa de LC.060

Abreviaturas:

	Los aminoácidos se abrevian en el código de tres letras (Leu) o de una letra (L).
25	S228P se refiere a un intercambio de serina a prolina en la posición 228 de la cadena pesada de IgG4.
	L234 se refiere al aminoácido leucina en la posición 234 según la numeración EU (Kabat).
	L234 se refiere a que el aminoácido leucina en la posición 234 se cambia por alanina.
	L235A se refiere a que el aminoácido leucina en la posición 235 se cambia por alanina.
30	PVA236 se refiere a que en la región 236 ELLG de IgG1 ó EFLG de IgG4 se cambia por PVA.
	GLPSS331 se refiere a que en la región 331 ALPAP de IgG1 ó GLPAP de IgG2 se cambia por GLPSS.
	Delta G236 se refiere a que el aminoácido en la posición 236 se deleciona.
	IgG4x se refiere a la mutación S228P en IgG4.
	LC2010-001 es un sinónimo de LC.001
35	Fc γ es sinónimo de Fc-gamma (Fc γ)

Otros cambios de secuencia de los anticuerpos se denominan de manera análoga.

OX40L humano soluble recombinante fusionado con una etiqueta histidina	hOX40L-His
OX40L murino soluble recombinante fusionado con una etiqueta histidina	mOX40L-His
OX40L humano soluble recombinante fusionado con una etiqueta Flag	hOX40L-Flag
OX40L murino soluble recombinante fusionado con una etiqueta Flag	mOX40L-Flag
OX40 humano soluble recombinante fusionado con Fc γ	hOX40 -hFc
Anticuerpo monoclonal de conejo anti-Fc γ murino	Anti-mFc
Anticuerpo monoclonal de cabra anti-Fc γ humano	Anti-hFc
Anticuerpo monoclonal murino anti-histidina	Anti-His
OX40 humano soluble recombinante fusionado con Fc γ murino	hOX40 -mFc
Anticuerpo monoclonal murino anti-TNF α	Anti-TNF α
Anticuerpo monoclonal murino anti-CD40L	Anti-CD40L
Factor α de necrosis tumoral	TNF α
Ligando CD40	CD40L
Anticuerpo monoclonal de rata anti-OX40L humano	TAG34
Anticuerpos monoclonales humanos anti-OX40L humano	LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033, LC.059, LC.060, LC.063

fitohemaglutinina

PHA

EJEMPLOSEjemplo 1

- 5 Generación de una línea celular de hibridoma productora de anticuerpos anti-OX40L
- Cultivo de hibridomas
- 10 Se cultivaron hibridomas de HumAb en IMDM (Cambrex), suero fetal bovino de clon 1 (Perbio Science), origen: factor de clonación de hibridoma (Igen), piruvato sódico, penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol, HAT (Sigma-Aldrich) y canamicina (Invitrogen) a 37°C y en 5% de CO₂.
- Procedimiento de inmunización de los ratones transgénicos
- 15 LC2010-001: seis HCo7 (2 machos y 4 hembras), cepa GG2201 (Medarex, San José, CA, USA) y 4 HCo12 (4 machos), cepa GG2198 (Medarex, San José, CA, USA) se inmunizaron alternativamente con 1x10⁶ células HEK293, transfectadas transitoriamente con un vector de expresión de OX40L humano (hOX40L) y 20 mg de dominio extracelular soluble de hOX40L. Se llevaron a cabo ocho inmunizaciones en total, cuatro inmunizaciones intraperitoneales (i.p.) con las células expresantes de hOX40L y cuatro inmunizaciones subcutáneas (s.c.) en la base de la cola con proteína recombinante. Para la primera inmunización, se mezclaron 100 ml de 1x10⁶ células HEK293-hOX40L con 100 ml de adyuvante de Freund completo (ACF, Difco Laboratories, Detroit, USA). Para todas las demás inmunizaciones, se utilizaron 100 ml de células en PBS o se mezcló proteína recombinante con 100 ml de adyuvante de Freund incompleto (AFI; Difco).
- 20
- 25 Tras observar que los títulos séricos de anti-hOX40L eran suficientes, los ratones recibieron dos refuerzos adicionales de 15 mg de dominio extracelular de hOX40L en 200 ml de PBS por vía intravenosa (i.v.) 4 y 3 días antes de la fusión.
- 30 LC2010-001, LC.059, LC.060 y LC.063 se derivaron de ratones HCo12.
- LC2010-005, -010, -019, -029 y -033: se inmunizaron cinco HCo7 (4 machos y 1 hembra), cepa GG2201 (Medarex, San José, CA, USA) con 20 mg de dominio extracelular soluble de hOX40L. Se llevaron a cabo siete inmunizaciones en total, cuatro intraperitoneales (i.p.) y tres subcutáneas (s.c.) en la base de la cola. Para la primera inmunización, se mezclaron 100 ml de proteína recombinante con 100 ml de adyuvante de Freund completo (ACF, Difco Laboratories, Detroit, USA). Para todas las demás inmunizaciones, se mezclaron 100 ml de proteína recombinante con 100 ml de adyuvante de Freund incompleto (AFI; Difco).
- 35
- 40 Tras observar que los títulos séricos de anti-hOX40L eran suficientes, los ratones recibieron dos refuerzos adicionales de 15 mg de dominio extracelular de hOX40L en 200 ml de PBS por vía intravenosa (i.v.) 4 y 3 días antes de la fusión.
- Generación de hibridomas
- 45 Se sacrificaron los ratones y se recogieron el bazo y los nódulos linfáticos flanqueantes de la aorta abdominal y la vena cava. Se llevó a cabo la fusión de esplenocitos y células de nódulo linfático con las células SP 2.0 de pareja de fusión siguiendo procedimientos operativos estándares.
- ELISA específico de antígeno
- 50 Se determinaron los títulos de anti-OX40L en sueros de ratones inmunizados mediante ELISA específico de antígeno. Se recubrió una placa (placa ELISA de 96 pocillos de fondo redondo, Greiner) con 0,1 mg/ml de OX40L purificado disuelto en PBS y se recubrió durante la noche a temperatura ambiente. A continuación, se bloquearon los pocillos con PBSTC (PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (Sigma-Aldrich Chemie BV) y suero de pollo al 2% (Gibco)) durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 55
- Las muestras de suero analizadas se diluyeron 1:50 en PBSTC y se añadieron a los pocillos. El suero obtenido de los ratones antes de la inmunización se disolvió 1:100 en PBSTC y se utilizó a modo de control negativo. Un anticuerpo de ratón dirigido contra OX40L humano se disolvió 1:50 en PBSTC y se utilizó a modo de control positivo.
- 60 Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron dos veces utilizando PBST (PBS que contenía Tween-20 al 0,05%). Se diluyó Gt- α -hulgG-HRP (Jackson) 1:5000 en PBSTC y se añadió a los pocillos que contenían las muestras analizadas y el control negativo. Se diluyó Rb- α -mIgG (Jackson)

1:3000 en PBSTC y se añadió a los pocillos que contenían el control positivo. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron tres veces con PBST y se revelaron con solución ABTSa recién preparada (1 mg/ml) (ABTS: 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 405 nm.

5

ELISA kappa

Para determinar si los hibridomas resultantes de la fusión generan anticuerpos humanos, se llevó a cabo un ELISA kappa. Se recubrieron placas de ELISA con anticuerpo de rata anti-cadena ligera kappa de IgG humana (DAKO) diluido 1/10.000 en PBS mediante la incubación durante la noche a 4°C. Tras descartar los pocillos, las placas se bloquearon mediante incubación con PBSTC (PBSC, suplementado con Tween-20 al 0,05% (PBSTC)) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, los pocillos se incubaron con sobrenadante de cultivo de hibridoma, diluido 1/2 en PBSTC. Se utilizó medio de cultivo diluido 1/2 en PBSTC a modo de control negativo, sirvió a modo de control positivo suero de ratón positivo para cadena ligera kappa diluido 1/100 en PBSTC. A continuación, se lavaron tres veces los pocillos y se incubaron con F(ab')₂ de rata anti-IgG humana conjugado con HRP (DAKO), diluido 1/2.000 en PBSTC durante 1 h a 37°C. Los pocillos se lavaron tres veces y se revelaron los ensayos con solución de ABTS[®] recién preparada (1 mg/ml) durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas de ELISA.

10

15

20 Ejemplo 2

Clonación y análisis de secuencias de dominios variables de HumAb anti-OX40L

(cadenas ligera kappa y pesada γ1)

25

Las secuencias de nucleótidos codificantes de la región variable de cadena ligera VL y la región variable de cadena pesada VH de los HumAb OX40L se aislaron mediante un procedimiento estándar de síntesis de ADNc/PCR.

Se preparó ARN total a partir de 1×10^6 - 1×10^7 células de hibridoma utilizando el kit GeneRacer[™] (Invitrogen). Se utilizó ARN derivado de hibridoma como molde para la síntesis de ADNc de primera cadena y la ligación del cebador oligo-dT GeneRacer[™]. Se llevaron a cabo síntesis de ADNc de 2a cadena y amplificación adicional por PCR de los fragmentos de ADNc codificantes de VL y VH con cebadores inversos de cadenas ligera y pesada complementarios a las secuencias de nucleótidos de la región constante de cadena ligera kappa y cadena pesada γ1 y cebador GeneRacer[™] 5'-específicos, respectivamente. Los productos de PCR se clonaron utilizando el kit de clonación TOPO[™] TA de Invitrogen[™] Life Technologies y pCR4-TOPO[™] como vector de clonación. Los productos de PCR clonados se identificaron mediante mapeado de restricción de los plásmidos apropiados utilizando EcoRI para la digestión y tamaños esperados/calculados de fragmentos de ADN de aproximadamente 740 y 790 pb para VL y VH, respectivamente.

30

35

40 Se determinó la secuencia de ADN de los fragmentos de PCR clonados mediante secuenciación de doble cadena.

El paquete informático del GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) versión 10.2 y Vector-NTI 8 (InforMax, Inc.) se utilizaron para el procesamiento general de los datos. Se alinearon las secuencias de ADN y de proteína utilizando el módulo CLUSTALW de GCG. Se realizaron alineaciones de las secuencias utilizando el programa GENEDOC (versión 2.1).

45

Ejemplo 3

Construcción de plásmidos de expresión para un HumAb IgG1 anti-OX40L

50

Los genes codificantes de las cadenas ligera y pesada de HumAb anti-OX40L se ensamblaron separadamente en vectores de expresión de célula de mamífero.

De esta manera, se unieron los segmentos génicos codificantes de la región variable de cadena ligera (VL) de HumAb anti-OX40L y de la región constante de cadena ligera kappa humana (CL, SEC ID n° 13, o de entre SEC ID n° 61, 65 ó 69), al igual que los segmentos génicos de la región variable de cadena pesada (VH) de HumAb anti-OX40L y la región constante de cadena pesada γ1 humana (CH1-bisagra-CH2-CH3, SEC ID n° 14, o de entre SEC ID n° 58, n° 62 ó n° 66).

55

60

Se proporciona información general sobre secuencias de nucleótidos de las cadenas ligeras y pesadas a partir de las que se deduce el uso de los codones, en: Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, publicación del NIH n° 91-3242, 1991.

La unidad de transcripción de la cadena ligera kappa de HumAb anti-OX40L está compuesta de los elementos siguientes:

- 5 - el intensificador y promotor tempranos inmediatos del citomegalovirus humano (CMVH),
- un 5'-UT sintético que incluye una secuencia de Kozak,
- una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina que incluye el intrón de secuencia de señal,
- el ADNc de cadena ligera variable HumAb anti-OX40L clonado dispuesto con un sitio de restricción BsmI único en el extremo 5' y un sitio donador de procesamiento y un sitio de restricción NotI único en el extremo 3'.
- 10 - La región constante de gen kappa genómico humano, que incluye el intrón 2 intensificador de Ig-kappa de ratón [Picard D. y Schaffner W., Nature 307:80-82, 1984], y la secuencia de señal de poliadenilación ("poli A") de inmunoglobulina kappa humana.

La unidad de transcripción de la cadena pesada de HumAb anti-OX40L está compuesta de los elementos siguientes:

- 15 - el intensificador y promotor tempranos inmediatos del citomegalovirus humano (CMVH),
- un 5'-UT sintético que incluye una secuencia de Kozak,
- una secuencia de señal de cadena pesada de inmunoglobulina murina modificada que incluye el intrón de secuencia de señal,
- 20 - el ADNc de cadena pesada variable de HumAb anti-OX40L clonado dispuesto con un sitio de restricción BsmI único en 5' y un sitio donador de procesamiento y un sitio de restricción NotI único en el extremo 3',
- la región constante genómica del gen de la cadena pesada γ 1 humana, incluyendo el intensificador de la IgM de ratón (Neuberger M.S., EMBO J. 2:1373-1378, 1983).
- la secuencia de señal de poliadenilación ("poli A") de la inmunoglobulina γ 1 humana.

Elementos funcionales de los plásmidos de expresión de cadena ligera kappa de HumAb anti-OX40L y de la cadena pesada γ 1: aparte de la cadena ligera kappa de HumAb anti-OX40L o el casete de expresión de la cadena pesada γ 1, dichos plásmidos contienen:

- 30 - un gen de resistencia a higromicina
- un origen de replicación, oriP, del virus Epstein-Barr (VEB),
- un origen de replicación del vector pUC18 que permite la replicación de este plásmido en *E. coli*, y
- un gen β -lactamasa que proporciona resistencia a la ampicilina a *E. coli*.

35 Ejemplo 4

Construcción de plásmidos de expresión para un HumAb IgG4 anti-OX40L

- 40 Se derivó un plásmido de expresión prototipo de cadena pesada γ 4 de anti-OX40L a partir del plásmido de expresión de cadena pesada γ 1 anti-OX40L mediante la sustitución de la región constante genómica de γ 1 humana y la secuencia de señal de poliadenilación ("poli A") de la inmunoglobulina γ 1 por la región constante genómica de γ 4 humana (SEC ID n° 15 ó de entre la región constante de γ 4 no mutada seleccionada de entre SEC ID n° 60, n° 64 ó n° 68) y la secuencia de señal de poliadenilación de la inmunoglobulina γ 4.

- 45 Para la expresión de las cadenas ligeras kappa de HumAb anti-OX40L, se utilizaron los mismos plásmidos de expresión que los indicados para IgG1 (ver anteriormente).

Ejemplo 5

- 50 Construcción de plásmidos de expresión para las IgG1 e IgG4 anti-OX40L mutantes (variantes) basadas en LC.001

- 55 Se crearon los plásmidos de expresión codificantes de las cadenas pesadas de γ 1 y γ 4 anti-OX40L mediante mutagénesis sitio-dirigida de los plásmidos de expresión de tipo salvaje utilizando el kit de mutagénesis sitio-dirigido QuickChange™ (Stratagene). Los aminoácidos se numeraron según la numeración EU (Edelman G.M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63:78-85, 1969; Kabat E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5a edición, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991).

Tabla 1

Isotipo	Nombre abreviado	Mutaciones	Descripción
IgG1	IgG1v1	PVA-236; GLPSS331 especificado por E233P; L234V; L235A; delta G236; A327G; A330S; P331S	La secuencia de aminoácidos Glu ₂₃₃ Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ Gly ₂₃₆ de la cadena pesada γ 1 humana se sustituye por la secuencia de aminoácidos Pro ₂₃₃ Val ₂₃₄ Ala ₂₃₅ de la cadena pesada γ 2 humana. La secuencia de aminoácidos Ala ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ala ₃₃₀ Pro ₃₃₁ de la cadena pesada γ 1 humana se sustituye por la secuencia de aminoácidos Gly ₃₂₇ Leu ₃₂₈ Pro ₃₂₉ Ser ₃₃₀ Se _{r331} de la cadena pesada γ 4 humana.
IgG1	IgG1v2	L234A; L235A	La secuencia de aminoácidos Leu ₂₃₄ Leu ₂₃₅ de la cadena pesada γ 1 se sustituye por la secuencia de aminoácidos Ala ₂₃₄ Ala ₂₃₅
IgG4	IgG4v1	S228P; L235E	Ser ₂₂₈ de la cadena pesada γ 4 humana se sustituye por Pro ₂₂₈ y Leu ₂₃₅ de la cadena pesada γ 4 humana se sustituye por Glu ₂₃₅
IgG4	IgG4x	S228P	Ser ₂₂₈ de la cadena pesada γ 4 humana se sustituye por Pro ₂₂₈

Ejemplo 6

Producción de HumAb anti-OX40L recombinantes

5 Se generaron HumAb recombinantes mediante transfección transitoria de células HEK293-EBNA adherentes (ATCC nº CRL10852) cultivadas en DMEM (Gibco) suplementadas con FCS al 10% con contenido ultrabajo de IgG (Gibco), glutamina 2 mM (Gibco), aminoácidos no esenciales al 1% v/v (Gico) y G418 250 mg/ml (Roche). Para la transfección se utilizó el reactivo de transfección Fugene™ 6 (Roche) en una proporción de reactivo (ml) a ADN (mg) 10 comprendida entre 3:1 y 6:1. Se expresaron las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina a partir de dos plásmidos diferentes utilizando una proporción molar de plásmido codificante de cadena ligera a plásmido codificante de cadena pesada de entre 1:2 y 2:1. Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo celular que contenían HumAb entre los días 4 y 11 posteriores a la transfección. Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta la purificación.

15 Se proporciona información general sobre la expresión recombinante de anticuerpo humano en, por ejemplo, HEK293, en: Meissner P. *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 75:197-203, 2001.

Ejemplo 7

Análisis de afinidad de los anticuerpos TAG34, LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029 y LC.033

25 Aparato: Biacore 3000, tampón de migración y reacción: HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,005%, pH 7,4), 25°C. Se llevó a cabo la inyección de analito a 7 concentraciones comprendidas entre 0,78 nM y 100 nM durante 3 minutos y se lavó con HBS-P durante 5 minutos. La regeneración de la superficie (superficie de dextrano carboximetilado, CM) se llevó a cabo mediante dos inyecciones de glicina 10 mM, pH 2,0, de 1 minuto cada una. El chip, formato de ensayo y secuencia de inyecciones y datos cinéticos corresponden a la descripción proporcionada en la tabla a continuación. Los datos cinéticos se calcularon mediante ajuste de los datos cinéticos a un modelo de unión 1:1 de Langmuir.

Tabla 2

Chip	Captura	Ligando	Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
CM5	Anti-mFcγ	TAG34	hOX40L-His	8,84x10 ⁴	3,32x10 ⁻⁵	3,75x10 ⁻¹⁰
CM5	Anti-hFcγ	LC.001	hOX40L-His	9,01x10 ⁴	7,16x10 ⁻⁹	<1,1x10 ⁻¹¹
CM5	Anti-hFcγ	LC.005	hOX40L-His	6,84x10 ⁴	2,02x10 ⁻⁷	<1,5x10 ⁻¹¹
CM5	Anti-hFcγ	LC.010	hOX40L-His	6,25x10 ⁴	2,5x10 ⁻⁵	3,99x10 ⁻¹⁰
CM5	Anti-hFcγ	LC.019	hOX40L-His	7,89x10 ⁴	7,53x10 ⁻⁸	<1,2x10 ⁻¹¹

CM5	Anti-hFcg	LC.029	hOX40L-His	$1,41 \times 10^5$	$2,4 \times 10^{-8}$	$< 7,1 \times 10^{-12}$
CM5	Anti-hFcg	LC.033	hOX40L-His	$7,01 \times 10^4$	$2,09 \times 10^{-7}$	$< 1,4 \times 10^{-11}$

No pudo medirse interacción entre TAG34 y mOX40L.

Evaluación de los datos y depósito de los datos de todos los ensayos Biacore

- 5 Se restaron los datos de control negativo (por ejemplo las curvas de tampón) de las curvas de muestras para la corrección de la deriva intrínseca de la línea base del sistema y para la reducción de la señal de ruido. Se utilizó el programa BiaEvaluation versión 4.01 para el análisis de los sensogramas y para el cálculo de los datos de afinidad.

10 Ejemplo 8

Ensayo de inhibición competitiva de anticuerpos anti-hOX40L que inhiben la interacción de hOX40L con hOX40 inmovilizado

- 15 Aparato: Biacore 3000, tampón de migración y reacción: HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,005%, pH 7,4), 25°C. Antes de la inyección, se preincubaron el analito (10 nM) y el competidor (ocho concentraciones comprendidas entre 0,78 nM y 100 nM) durante como mínimo 20 minutos a 22°C. La inyección de analito +/- competidor se llevó a cabo durante 3 minutos y se lavó con HBS-P durante tres minutos. La regeneración de la superficie se llevó a cabo mediante dos inyecciones de glicina 10 mM, pH 2,0, de 1 minuto cada una. El chip, formato de ensayo y secuencia de inyecciones y datos cinéticos corresponden a la descripción proporcionada en la tabla 3 a continuación.
- 20

Tabla 3

Chip	Ligando	Analito	Competidor	IC50 (M)
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	TAG34	7×10^{-9}
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	LC.001	4×10^{-9}
CM5	OX40-hFc	hOX40L-His	LC.005	3×10^{-9}

- 25 Todos los anticuerpos inhibieron la unión de OX40L a OX40 en solución (afinidad en solución). LC.001 y LC.005 mostraron un valor de IC50 más bajo que TAG34.

Ejemplo 9

- 30 Caracterización de epítomos de los anticuerpos anti-OX40L TAG34, LC.001, LC.005, LC.010, LC.019, LC.029, LC.033, LC. 060

- 35 Aparato: Biacore 3000, tampón de migración y reacción: HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,005%, pH 7,4), 25°C. Los grupos epitópicos se determinaron mediante competición cruzada entre los anticuerpos indicados. Antes de la inyección, se preincubaron el analito (50 nM) y el competidor (100 nM) durante como mínimo 20 minutos a 22°C. Inyección de analito +/- competidor durante dos minutos, lavado con HBS-P durante tres minutos. La regeneración de la superficie se llevó a cabo mediante dos inyecciones de glicina 10 mM, pH 2,0, de 1 minuto cada una. El chip, formato de ensayo y secuencia de inyecciones y datos cinéticos corresponden a la descripción proporcionada en la tabla 4 a continuación.
- 40

Tabla 4

Chip	Captura	Ligando	Analito	Competidor	Epítomo
CM5	Anti-hFcg	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	TAG34	A
CM5	Anti-hFcg	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.001	A
CM5	Anti-hFcg	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.005	B
CM5	Anti-hFcg	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.010	B
CM5	Anti-hFcg	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.019	AVB
CM5	Anti-hFcg	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.029	B
CM5	Anti-hFcg	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.033	A
CM5	Anti-hFcg	Anti-OX40L (A,B,C)	hOX40L-His	LC.060	A

- 45 El epítomo de OX40L reconocido por TAG34 se definió como epítomo A. Sin embargo, TAG34 no se unía a OX40L desnaturalizado (en una transferencia western) a una concentración de anticuerpo de 100 ng. Los anticuerpos en un grupo epitópico (A o B) mostraban actividad de inhibición cruzada, mientras que los anticuerpos de grupos diferentes mostraban señales de unión aditivas. LC.019 neutralizaba otros anticuerpos del grupo A, así como del grupo B.

Ejemplo 10

Especificidad de unión de TAG34, LC.001 y LC.005 a CD40L y TNF α

5 Aparato: Biacore 3000, tampón de migración y reacción: HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,005%, pH 7,4), 25°C. Se llevó a cabo la inyección de analito durante tres minutos a 100 nM y a 500 nM y se lavó con HBSP durante dos minutos. La regeneración de la superficie se llevó a cabo mediante dos inyecciones de HCl 100 mM de 1 minuto cada una. El chip, formato de ensayo y secuencia de inyecciones y datos cinéticos corresponden a la descripción proporcionada en la tabla 5 a continuación.

10

Tabla 5

Chip	Captura	Ligando	Analito
CM5	Anti-mFcg Anti-hFcg	TAG34 LC.001 LC.005 Anti-TNF α Anti-CD40L	TNF α CD40L OX40L

15 En estos ensayos, CD40L mostró cierta unión no específica a todos los anticuerpos o a la superficie del chip, pero tras restar las señales de fondo, este ensayo mostró que no se producía unión no específica de TNF α y CD40L (hasta 500 nM) a los anticuerpos inmovilizados TAG34, LC.001 y LC.005.

Ejemplo 11

Análisis de afinidad de los anticuerpos LC.001-IgG1 y LC.001-IgG4x

20

25 Aparato: Biacore 3000, tampón de migración y reacción: HBS-P (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,005%, pH 7,4), 25°C. Se llevó a cabo la inyección de analito a ocho concentraciones comprendidas entre 0,78 nM y 100 nM durante tres minutos y se lavó con HBS-P durante cinco minutos. La regeneración de la superficie se llevó a cabo mediante dos inyecciones de HCl 100 mM de 1 minuto cada una. El chip, formato de ensayo y secuencia de inyecciones y datos cinéticos corresponden a la descripción proporcionada en la tabla a continuación. Los datos cinéticos se calcularon mediante ajuste de los datos cinéticos a un modelo de unión 1:1 de Langmuir.

Tabla 6

Chip	Captura	Ligando	Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
CM5	Anti-mFcg	LC.001	hOX40L-His	4,27x10 ⁴	3,46x10 ⁻⁸	<2,3x10 ⁻¹¹
CM5	Anti-mFcg	LC.001-IgG4x	hOX40L-His	4,85x10 ⁴	7,72x10 ⁻⁸	<2,06x10 ⁻¹¹

30 LC.001 y LC-001-IgG4x mostraban la misma afinidad para hOX40L-His.

Ejemplo 12

Ensayo ELISA para la detección de anticuerpos de unión a OX40L

35

Se recubrieron placas recubiertas con SA (placa de ELISA de 96 pocillos de fondo plano, Microcoat) con 0,5 mg/ml de OX40L biotinilado disuelto en tampón de incubación (TI=PBS que contenía Tween-20 al 0,1% (Serva) y proteína de bloqueo al 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron dos veces con tampón de lavado (TL=solución salina que contenía Tween-20 al 0,1%).

40

45 Las muestras (sobrenadantes de cultivo celular o anticuerpos purificados) se diluyeron en serie en TB y se añadieron a los pocillos. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron dos veces utilizando TL. Seguidamente se diluyó un conjugado de un anticuerpo de cabra contra la IgG humana y POD (Dianova) hasta 50 ng/ml en TB y se añadió a los pocillos. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron dos veces con TB y se revelaron con solución ABTS[®] lista para utilizar (Roche) a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 405 nm tras alcanzar la absorbancia de la concentración más alta una DO suficiente (fig. 1a). Los valores obtenidos de EC₅₀ se encontraban en el intervalo de entre 3 y 8 nM.

Ejemplo 13

Ensayo ELISA de detección de anticuerpos que inhibe la interacción de OX40 humano/OX40L humano

50

Se recubrieron placas recubiertas con SA (placa de ELISA de 96 pocillos de fondo plano, Microcoat, Alemania) con 0,5 mg/ml de OX40L biotinilado disuelto en TB durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron dos veces con TL (tampón PBS, TweenTM-20 al 0,1% (p/v)).

- 5 Las muestras se diluyeron en TI a una concentración de 1 mg/ml y se añadieron a los pocillos en diluciones en serie. Con el fin de conseguir la unión máxima de OX40 a OX40L en algún pocillo sólo se añadió TI. A continuación, a cada pocillo se añadió una solución de OX40 humano conjugado con digoxigenina (Roche Diagnostics GmbH, DE) a una concentración de 0,2 mg/ml. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las placas se lavaron dos veces utilizando TL. Se diluyó <digoxigenina>-POD de oveja (Roche) hasta 50 mU/ml en TI y se añadió a los pocillos. Las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las placas se lavaron dos veces con TB y se revelaron con solución ABTS[®] lista para utilizar (Roche) a temperatura ambiente (TA) en la oscuridad. Se midió la absorbancia a 405 nm tras 10 a 20 minutos (fig. 1b). Los valores obtenidos de EC₅₀ se encontraban en el intervalo de entre 1 y 4 nM.

15 Ejemplo 14

Ensayo FACS de detección de HumAb que inhiben la interacción de OX40 humano con OX40L humano expresado sobre células K562 (células K562_OX40L).

- 20 Propósito: ensayo para la determinación de la propiedad de HumAb de hOX40L de bloquear la interacción de la proteína de fusión de hOX40 marcado con Dig: hFc con la línea celular K562_hOX40L expresante de hOX40L.

Procedimiento: el ensayo se llevó a cabo con hOX40 marcado con Dig:hFc como "reactivo de ensayo" y HumAb hOX40L como "competidor".

- 25 Reactivo de ensayo: solución madre 0,5 mg/ml, diluida 1:10 en PBS), 100 ml de anti-digoxigenina-FLUOS diluido 1:25 en PBS/BSA al 0,5%/reactivo de bloqueo al 1% (Roche Diagnostics GmbH, DE).

- 30 Se lavaron 2×10^5 células K562_OX40L (cultivadas en ISF-0) en 2 ml de PBS y se resuspendieron en 100 ml de PBS. A continuación, se añadió competidor en PBS (relación competidor/reactivo de 0:1/1:1/1,5:1/2:1/2,5:2/5:1). Seguidamente se incubó durante 30 minutos, TA y luz diurna. A continuación se añadió reactivo (en PBS); tiempo de incubación: 30 minutos, TA y luz diurna. Las células se lavaron con 2 ml de PBS y se peletizaron mediante centrifugación. Se añadió el anticuerpo secundario para tinción (anti-digoxigenina-fluoresceína, fragmentos Fab (Roche, 1207741)) y se incubó durante 30 minutos, a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron con 2 ml de PBS y se peletizaron mediante centrifugación. Después, las células se resuspendieron en 0,5 ml de PBS. Se llevó a cabo la medición de las muestras en un FACS-Scan (fig. 2).

Ejemplo 15

- 40 Ensayo funcional para la determinación de la capacidad de los anticuerpos de inhibir la señalización hOX40/hOX40L ("ensayo NFκB")

Se cultivaron células HeLa de tipo salvaje (ta) y células HeLa expresantes de OX40 humano (HeLa_OX40) en medio esencial mínimo (MEM), 1x piruvato sódico, 1x aminoácidos no esenciales (Gibco), FCS al 10% y en el caso de las células recombinantes + 600 mg/ml de G418. Se cultivaron K562 y K562 expresante de OX40L en medio ISF-O y en el caso de las células recombinantes se añadieron 200 mg/ml de G418.

- 50 Se sembraron HeLa_wt o HeLa_OX40 a una densidad celular de 3×10^4 células/100 ml en una placa de 96 pocillos sin G418 y se incubaron durante la noche en un incubador de CO₂. Se añadieron células K562_wt o K562_OX40L en una proporción célula a célula de 1:1. Se descongelaron células K562 fijadas con formalina o K562 expresantes de OX40L no fijadas con formalina (congeladas a -70°C) y se diluyeron 1:10 en MEM/FCS al 10%; las células K562_OX40L se preincubaron con anticuerpo contra OX40L durante 30 minutos a TA. El tiempo de estimulación con las células K562_OX40L fue de entre 30 y 150 minutos. La extracción de proteínas de los núcleos celulares tuvo lugar siguiendo las instrucciones de los proveedores, con el kit NE de Active Motif. Se utilizó el ELISA-NFκB TransAM de Active Motif (el ensayo se llevó a cabo siguiendo las instrucciones de los proveedores) para determinar la señalización de OX40, resultando en la activación de NFκB. La medición se llevó a cabo a longitudes de onda de absorción de 450/620 nm en un lector de MTP Tecan (fig. 3). Los valores obtenidos de IC₅₀ para todos los anticuerpos LC se encontraban en el intervalo de entre 0,6 y 5 nM.

60 Ejemplo 16

Ensayo de activación de células T

Principio de ensayo:

se activaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBL) con una concentración subóptima del mitógeno de células T fitohemaglutinina (PHA) y se coestimularon con células K562 sobreexpresantes de OX40L. Bajo las condiciones de ensayo, las células T activadas incubadas 24 h a 37°C produjeron IL-2. Se midió la citoquina en el sobrenadante utilizando un ensayo ELISA. Para determinar el efecto de bloqueo de un mAb, las células K562_OX40L se preincubaron durante 1 hora con diluciones apropiadas del anticuerpo antes del cocultivo con PBL.

Procedimiento:

Se separaron células monucleares de sangre periférica humana (PBL) de sangre completa heparinizada, mediante centrifugación en gradiente de densidad en Histopaque®-1077 (Sigma). Tras lavar con solución de Hank, las células se contaron utilizando solución de Turk y se resuspendieron a una concentración de 10^6 /ml en RPMI-1640 (Gibco), y se suplementó con penicilina, estreptomocina y glutamina (Gibco n° 10378-016) y FBS al 10%. Se mantuvieron células K562 de control (tipo salvaje) en el mismo medio RPMI suplemento tal como se ha indicado. Se mantuvieron células K562 transfectadas con OX40L en el mismo medio suplementado con geneticina (G418, Gibco) a una concentración final de 50 mg/ml. Se diluyeron las células K562 (WT o OX40L⁺) con el mismo medio a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/ml y se dispensaron en cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos a razón de 50 ml/pocillo ($0,75 \times 10^4$ /pocillo). Se añadieron diluciones apropiadas del mAb a las células, en un volumen de 20 ml/pocillo, y se incubaron durante 1 h a 37°C. Cada dilución se sometió a ensayo en pocillos por duplicado. Se añadió PBL a un volumen de 100 ml/pocillo (10^5 células/pocillo). La proporción final de PBL a células K562 era de ~13:1. Se añadió PHA (10X) (Sigma L-9132) a razón de 20 ml/pocillo (concentración final: 0,75 mg/ml). Se completó el volumen total de los pocillos a 200 ml con RPMI/FCS al 10%. Las placas se incubaron a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂ durante 24 h. Tras la centrifugación de las placas, se recogieron los sobrenadantes y se sometieron a ensayo para IL-2 mediante ELISA (BD, San Diego, CA, n° de cat. 2627KI), siguiendo las instrucciones del fabricante (fig. 4). Para calcular la IC₅₀ (concentración de mAb que bloquea el 50% de la liberación de IL-2 por las PBL estimuladas con OX40L), la concentración de IL-2 de fondo producida en los cultivos de control (PBL+PHA+K562WT) se restó de la IL-2 total producida por PBL estimuladas con células K562-OX40L⁺ (fig. 5). IC₅₀ TAG34: 0,07 mM; LC.001: 2 nM; LC.005: 10 nM. Los valores obtenidos de EC₅₀ se encontraban en el intervalo de entre 2 y 10 nM.

Ejemplo 17

Ensayo de tétanos ('ensayo TT') que analiza el efecto inhibitor de los anticuerpos sobre los linfocitos de sangre periférica estimulados con toxoide tetánico

Se aislaron células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) a partir de sangre heparinizada mediante Ficoll-Hypaque. En la mayoría de casos se utilizaron PBMC recién aisladas para este ensayo. En algunos casos también se utilizaron PBMC criopreservadas. El medio para este ensayo era RPMI que contenía suero AB masculino humano al 10% (Sigma-Aldrich), glutamina 2 mM y Pen/Strep (mezcla lista para utilizar de los antibióticos penicilina y estreptomocina (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), liofilizado reconstituido en 20 ml; utilización de 2 ml por cada 1.000 ml de medio).

Con el fin de que pudiesen adherirse al plástico, se preincubaron 300.000 PBMC en cada pocillo durante la noche en placas de 96 pocillos de fondo plano.

Al día siguiente se añadió toxoide tetánico (TT) (Chiron Behring) a los pocillos a una concentración final de entre 2 y 5 mg/ml. Los pocillos de control positivo (máxima proliferación/estimulación) sólo contenían TT; a todos los demás pocillos se añadieron anticuerpos (en forma de IgG purificadas) a una concentración final de 10 mg/ml. Se incluyó el mAb murino TAG-34 en el ensayo (concentración final: 10 mg/ml). A modo de control de fondo no estimulador se utilizó medio solo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Tras seis días de incubación adicional (37°C, 5% de CO₂, 95% de humedad), se añadió ³H-timidina a una concentración final de 1 mCurie/ml, y tras un periodo de incubación adicional de 16 h, se recolectaron las placas y se determinó la ³H-timidina incorporada en un contador beta (fig. 6).

Ejemplo 18

Reactividad cruzada de los anticuerpos de OX40L con OX40L de ratón

Para determinar la capacidad de los anticuerpos de la invención de reaccionar cruzadamente con OX40L murino, se incubaron anticuerpos diluidos en serie y anticuerpos de control con células K562-mOX40L que expresaban establemente mOX40L. También se evaluó la unión a las células K562 WT y a las células K562-hOX40L, que

expresaban establemente hOX40L. A modo de control negativo se utilizó un anticuerpo HumAb dirigido contra la hemocianina de lapa americana (α -KLH). Se incluyó el anticuerpo RM134L, anticuerpo de rata anti-mOX40L (eBioscience, San Diego, CA) a modo de control positivo de la expresión de mOX40L. Se incluyó el anticuerpo TAG-34, anticuerpo de ratón anti-hOX40L (MBL, Nagoya, Japón) a modo de control positivo de la expresión de hOX40L.

5 Para la detección de los anticuerpos humanos unidos, se utilizó un anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con fluoresceína (FITC). Para la detección de RM134L unido, se utilizó un anticuerpo de conejo anti-IgG de rata biotinilado (DAKO, Glostrup, Dinamarca) en combinación con estreptavidina, conjugado con ficoeritrina (PE) (DAKO). Para la detección de TAG-34 unido, se utilizó un anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con FITC. Los cálculos de valores de EC_{50} o de unión máxima a 20 mg/ml (B_{max}) de los HumAb sometidos a ensayo se calcularon a partir de la regresión no lineal (curva sigmoideal de respuesta a dosis con pendiente variable) utilizando el software Graphpad Prism.

Resultados:

15 LC.001 según la invención fue capaz de unirse a hOX40L, tal como indica un valor de EC_{50} de 5.16 ± 2.93 mg/ml y un valor de B_{max} (IFM) de 385,22, pero no a mOX40L o a células WT, tal como muestran los valores de B_{max} (IFM) de 11,41 y 9,67, respectivamente. Además, LC.001 según la invención también fue capaz de unirse eficientemente a hOX40L, tal como indica un valor de EC_{50} de 8.19 ± 1.05 mg/ml y un valor de B_{max} (IFM) de 311,30, pero no a mOX40L o a células WT, tal como muestran los valores de B_{max} (IFM) de 13,47 y 9,58, respectivamente. Tal como se esperaba, el control negativo de α -KLH no se unió a ninguna de las células (fig. 7). Por lo tanto, los anticuerpos de OX40L según la invención muestran una unión por lo menos 30 veces más baja a OX40L de ratón que a OX40L humano.

Ejemplo 19

25 Potencial de los HumAb de OX40L de activar el sistema del complemento

ELISA de unión de C1q y C3c

30 Para determinar la capacidad de los anticuerpos de la invención de inducir la unión de C1q y la activación de C3, se recubrió una placa de ELISA con anticuerpos diluidos en serie y anticuerpos de control. A modo de control negativo se utilizó IgG4 humano (The Binding Site, Birmingham, Inglaterra), que se une muy débilmente a C1q. Se incluyó IgG1 humano (The Binding Site) y α -KLH (IgG1) a modo de controles positivos. A continuación, se incubaron anticuerpos recubiertos con C1q recombinante o suero agrupado humano, como fuente de C3. Para la detección de C1q unido, se utilizó un anticuerpo de conejo dirigido contra C1q (DAKO) en combinación con anticuerpo porcino anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (DAKO). Para la detección de C3c activado (generado mediante la activación de C3), se utilizaron un anticuerpo de ratón anti-C3c humano (DAKO) en combinación con un anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón, conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Para evaluar las diferencias de eficiencia de recubrimiento, se visualizaron los anticuerpos recubiertos con un anticuerpo de cabra anti-IgG humana, conjugado con HRP. Los cálculos de valores de EC_{50} o de unión máxima a 10 mg/ml (B_{max}) de los HumAb sometidos a ensayo se calcularon a partir de la regresión no lineal (curva sigmoideal de respuesta a dosis con pendiente variable) utilizando el software Graphpad Prism.

45 Resultados:

LC.001 según la invención fue capaz de unirse eficientemente a C1q, tal como indica un valor de EC_{50} de $2,19 \pm 0,42$ mg/ml y un valor de B_{max} (DO405) de 3,089. Además, tanto la IgG humana de control positivo como anti-KLH pudieron unirse eficientemente a C1q, tal como indican los valores de EC_{50} de $4,17 \pm 1,08$ mg/ml y $2,57 \pm 1,51$ mg/ml, respectivamente, y valores de B_{max} (DO405) de 2,685 y 3,306, respectivamente. Tal como se esperaba, la IgG4 humana de control negativo no se unía a C1q, tal como muestra un valor de B_{max} (DO405) de 0,353. Además, LC.001IgG4x según la invención había perdido la capacidad de unirse a C1q, tal como muestra un valor de B_{max} (DO405) de 0,357.

55 En línea con las capacidad de unión a C1q, se produjo deposición de C3c inducida por LC.001 de una manera dependiente de la concentración de anticuerpo, con un valor de EC_{50} de $2,67 \pm 0,16$ mg/ml y un valor de B_{max} (DO405) de 2,614. Además, tanto la IgG humana y anti-KLH de control positivo pudieron inducir eficientemente la deposición de C3c, tal como indican los valores de EC_{50} de $5,45 \pm 0,36$ mg/ml y $2,16 \pm 0,26$ mg/ml, respectivamente, y valores de B_{max} (DO405) de 2,543 y 2,633, respectivamente. Tal como se esperaba, la IgG4 humana de control negativo no indujo la deposición de C3c, tal como muestra un valor de B_{max} (DO405) de 0,095. Además, LC.001IgG4x según la invención había perdido la capacidad de inducir la deposición de C3c, tal como muestra un valor de B_{max} (DO405) de 0,090 (figs. 8 y 9).

Ejemplo 20

Potencial de los HumAb de OX40L de unirse a los receptores I, IIa y IIb de Fc γ

5 La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) inducida por IgG se encuentra mediada por los receptores de Fc γ (Fc γ R) sobre las células efectoras. Para determinar la capacidad de los anticuerpos de la invención de unirse a los Fc γ R, se incubaron células IIA1.6 (derivadas mediante dilución limitante a partir de células IIA1; Jones B. *et al.*, J. Immunol. 136:348-356, 1986) establemente transfectadas con Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIb humanos y células de tipo salvaje, con anticuerpos diluidos en serie y anticuerpos de control. A modo de controles negativos se utilizaron IgG2 humana (The Binding Site Ltd., Reino Unido), que no se une a Fc γ RI, e IgG4 humana (The Binding Site), que no se une a Fc γ RII. Se incluyó IgG1 humana (The Binding Site) como control positivo de la unión de Fc γ RI e IgG3 humana (The Binding Site) de la unión de Fc γ RII. Los anticuerpos unidos se detectaron mediante análisis de FACS utilizando un anticuerpo dirigido contra IgG humana conjugada con ficoeritrina (PE). Los cálculos de valores de EC₅₀ o de unión máxima a 10 mg/ml (Bmax) de los HumAb sometidos a ensayo se calcularon a partir del ajuste de la curva de regresión no lineal (pendiente variable) utilizando el software Graphpad Prism.

20 LC.001 según la invención fue capaz de unirse eficientemente a Fc γ RI (en grado comparable al anticuerpo IgG1 de control), tal como indica un valor de EC₅₀ de 0,11±0,03 mg/ml y un valor de Bmax (MFI) de 8041,54, pero no a Fc γ RIIa y a Fc γ RIIb, tal como muestran los valores de Bmax (MFI) de 25,06 y 21,18, respectivamente.

25 LC.0011gG4x era menos eficiente en la unión a Fc γ RI que LC.001, y comparable al anticuerpo IgG4 de control, con un valor de EC₅₀ de 0,86±0,12 mg/ml y un valor de Bmax (IFM) de 6.030,07. No se observó unión de LC.001 IgG4x a Fc γ RIIa y a Fc γ RIIb (valores de Bmax (IFM) de 21,40 y 19,27, respectivamente), mientras que el anticuerpo IgG3 de control era capaz de unión (valores de Bmax (IFM) de 536,65 y 418,59, respectivamente) (fig. 10). Por lo tanto, el valor de EC₅₀ de la unión a Fc γ RI para LC.0011gG4x era ocho veces el valor de EC₅₀ del anticuerpo LC.001.

Ejemplo 21

Potencial de los HumAb de OX40L de unirse a Fc γ RIIIa sobre las células NK

30 Para determinar la capacidad de los anticuerpos de la invención de unirse a Fc γ RIIIa (CD16) sobre las células asesinas naturales (NK), se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se incubaron con 20 mg/ml de anticuerpo HumAb y anticuerpos de control en presencia o en ausencia de 20 mg/ml de un anticuerpo de bloqueo de ratón contra Fc γ RIIIa (anti-CD16, clon 3G8, RDI, Flanders, NJ) con el fin de verificar la unión mediante Fc γ RIIIa. A modo de controles negativos se utilizó IgG2 e IgG4 humanos (The Binding Site), los cuales no se unen a Fc γ RIIIa. Se incluyeron IgG1 e IgG3 humanos (The Binding Site) a modo de controles positivos de la unión de Fc γ RIIIa. Los anticuerpos unidos sobre las células NK se detectaron mediante análisis de FACS utilizando un anticuerpo de ratón anti-CD56 humano marcado con PE (marcador de superficie celular de NK) (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) en combinación con un anticuerpo F(ab)₂ de cabra anti-IgG (Fc) humana marcado con FITC (Protos Immunoresearch, Burlingame, CA). Se determinó el nivel máximo de unión a 20 mg/ml (Bmax) del HumAb sometido a ensayo.

45 LC.001 fue capaz de unirse eficientemente a Fc γ RIIIa (a nivel comparable al anticuerpo IgG1 de control), tal como indica un valor de Bmax (IFM) de 641,37. La adición de un anticuerpo de bloqueo contra Fc γ RIIIa anuló la unión de LC.001 a las células NK (valor de Bmax (IFM) de 194,61, comparado con una tinción de fondo de 145,38). LC.001 IgG4x no se unía a Fc γ RIIIa y se comportó de manera comparable al anticuerpo IgG4 de control, con un valor de Bmax (IFM) de 170,52, resultando en una Bmax de LC.001 IgG4x que era de sólo aproximadamente 10% del valor Bmax de LC.001. La adición de un anticuerpo de bloqueo contra Fc γ RIIIa no presentó ningún efecto sobre la unión de LC.001 IgG4x (valor de Bmax (IFM) de 174,26) (fig. 11).

Ejemplo 22

Efecto de la unión de hmAb_hOX40L y mAb TAG-34 a HUVEC (células endoteliales de la vena umbilical humana primarias / PromoCell)

55 Se ha descrito que las células endoteliales expresan hOX40L (Kotani A. *et al.*, Immunol. Lett. 84:1-7, 2002). Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) expresan naturalmente hOX40L y, por lo tanto, pudieron utilizarse como "modelo de célula endotelial". El objetivo del presente ensayo era determinar el destino de hOX40L sobre las células HUVEC tras la unión a los anticuerpos TAG-34 y LC.001.

60 Se descongelaron HUVEC y se expandieron en medio ECG-M más FCS al 2% durante 4 días en matraces T175 (Sarstedt). Se sembraron las células en placas de 24 pocillos (10.000 células/pocillo).

Tras 3 días, se cambió el medio a ECG-M + FCS al 0,5%. Se añadió anticuerpo (<KLH> (anticuerpo contra la hemocianina de lapa americana), TAG-34 ó LC.001 para la inducción de modulación negativa) a una concentración de 10 mg/ml y se incubó durante 2,5 h ó 24 h. Las células HUVEC se tiñeron nuevamente con TAG-34 ó con LC.001. Se realizó tinción FCS con anticuerpo secundario contra IgG murina, marcada con Alexa488 (= <m>) o contra IgG humana, marcada con Alexa488 (= <h>), cada una a 1,0 mg/ml. Se realizó la medición de FACS en FACS-scan (Becton Dickinson) y se calculó la intensidad de fluorescencia media (IFM).

Se utilizó el anticuerpo <KLH> a modo de control negativo no específico.

La Tabla 7 muestra que la adición de LC.001 no resulta en la modulación negativa de la expresión de OX40L sobre las células HUVEC ni tras 2,5 h ni tras 24 h (comparar la línea 4 con las líneas 5 y 6). Sin embargo, la adición de TAG-34 mostró una fuerte modulación negativa (aproximadamente de 3 veces) de hOX40L sobre las células HUVEC tras 2,5 h y también tras 24 h (comparar la línea 10 con las líneas 11 y 12).

Los anticuerpos según la invención a una concentración de 10 mg/ml no inducen la regulación negativa de la expresión de OX40L sobre las células HUVEC.

Tabla 7

mAb utilizado para la modulación negativa	mAb utilizado para la tinción	mAb secundario para FACS	IFM	
			2,5 h	24 h
1. control de medio	-	<h>	5,17	5,39
2. control de medio	LC.001	<h>	28,52	24,99
3. <KLH>	-	<h>	4,76	4,74
4. <KLH>	LC.001	<h>	31,44	23,07
5. LC.001	-	<h>	36,52	30,78
6. LC.001	LC.001	<h>	38,58	38,69
7. control de medio	-	<m>	3,66	3,18
8. control de medio	TAG-34	<m>	31,81	25,32
9. <KLH>	-	<m>	3,68	3,43
10. <KLH>	TAG-34	<m>	30,79	31,58
11. TAG-34	-	<m>	9,44	7,39
12. TAG34	TAG-34	<m>	8,97	14,89

Ejemplo 23

Análisis de transferencia western de TAG34, LC.001 y LC.005

Se prepararon 40 y 100 ng de hOX40L-His (R&D Systems, con un tamaño teórico de 28 a 34 kDa) y el marcador de peso molecular Magik Mark XP (Invitrogen; 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120 y 220 kDa) para la electroforesis en gel. Por lo tanto, se mezclaron x ml de proteína, 2,5 ml de tampón para muestras LDS (sal dodecilsulfato de litio) de NuPage, 1 ml de agente reductor (10x) de NuPage y H₂O hasta 10 ml, y se desnaturalizó durante 10 minutos a 70°C. A continuación, las muestras se cargaron en un gel NuPage (Novex, Bis-Tris al 10%) y se realizó la migración durante 1 h a 150V en tampón de migración MOPS 1x (Novex).

Se transfirió el gel con un sistema Semi-Dry-Blot sobre una membrana de PVDF (Millipore; activación de la membrana mediante 5 minutos de incubación en metanol y 10 minutos de incubación en tampón de transferencia 1x) utilizando tampón de transferencia 1x de NuPage (tampón 1x, antioxidante al 0,1%, metanol al 10%) durante 1 h/50 mA en una cámara semiseca. La membrana se bloqueó en PBS 1x/leche al 5%/Tween al 0,5% bajo agitación durante 1 h a TA. El anticuerpo primario (pAB) se diluyó en 1x PBS/leche al 1%/Tween al 0,5%, se añadió y se incubó durante la noche a 4°C.

LC.001 : 1,9 µl (1,6 µg) en un volumen total de 4 ml
 LC.005 : 1,1 µl (1,6 µg) / 4 ml
 TAG34: 1,6 µl (1,6 µg) / 4ml

La membrana se lavó 3x durante 10 minutos en PBS 1x/Tween al 0,5%. El anticuerpo secundario (sAB) se diluyó en PBS 1x/leche al 1%/Tween al 0,5 %, se añadió y se incubó durante 1,5 h a TA. Para LC.001 y LC.005, se utilizó anticuerpo policlonal contra IgG humana (Pierce) a una dilución de 1:10.000 como sAB; para TAG34 se utilizó anticuerpo policlonal contra IgG de ratón del kit de transferencia western Lumi-Light (Roche) a una dilución de 1:400 como sAB. La membrana se lavó 2x durante 30 minutos con PBS 1x/Tween al 0,5%. Para la detección se utilizó el kit de transferencia western Lumi-Light (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados de la

transferencia western se muestran en la figura 12. LC.001 fue capaz de detectar (dodecilsulfato) OX40L desnaturalizado, mientras que LC.005 y TAG34 no se unieron a OX40L desnaturalizado.

Lista de referencias

- 5 Akiba, H., *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 251 (1998) 131-136
 Akiba, H., *et al.*, J. Exp. Med. 191 (2000) 375-380
 Angal, S., *et al.*, Mol. Immunol. 30 (1993) 105-108
 Aplin, J.D., and Wriston, J.C. Jr., CRC Crit. Rev. Biochem. 10 (1981) 259-306
 10 Arestides, R.S., *et al.*, Eur. J Immunol. 32 (2002) 2874-2880
 Armour, K.L., *et al.*, Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624
 Ausubel, F., *et al.*, ed., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)
 Barnes, L.M., *et al.*, Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270
 15 Barnes, L.M., *et al.*, Cytotechnology 32 (2000) 109-123
 Baum, P.R., *et al.*, EMBO J. 13 (1994) 3992-4001
 Blazar, B.R., *et al.*, Blood 101 (2003) 3741-3748
 Boerner, P., *et al.*, J. Immunol. 147 (1991) 86-95
 Bruggemann, M., *et al.*, Year Immunol. 7 (1993) 33-40
 20 Brunhouse, R., and Cebra, J.J., Mol. Immunol. 16 (1979) 907-917
 Burgess, J.K., *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 113 (2004) 683-689
 Burton, D.R., *et al.*, Nature 288 (1980) 338-344
 Burton, D.R., Mol. Immunol. 22 (1985) 161-206
 Capel, P.J., *et al.*, Immunomethods 4 (1994) 25-34
 25 Carter, P., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289
 Chen, J., *et al.*, EMBO J. 12 (1993) 821-830
 Chen, J., *et al.*, Int. Immunol. 5 (1993) 647-656
 Choi, T.K., *et al.*, Nat. Genet. 4 (1993) 117-123
 Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)
 30 de Haas, M., *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-341
 Duncan, A.R., and Winter, G., Nature 332 (1988) 738-740
 Durocher, Y., *et al.*, Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9
 Edelman, G.M., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1969) 78-85
 Edge, A.S., *et al.*, Anal. Biochem. 118 (1981) 131-137
 35 EP 0 307 434
 Fishwild, D.M., *et al.*, Nat. Biotechnol. 14 (1996) 845-851
 Geisse, S., *et al.*, Protein Expr. Purif. 8 (1996) 271-282
 Gessner, J.E., *et al.*, Ann. Hematol. 76 (1998) 231-248
 Harding, F., and Lonberg, N., Ann. N. Acad. Sci. 764 (1995) 536-546
 40 Hezareh, M., *et al.*, J. Virol. 75 (2001) 12161-12168
 Higgins, L.M., *et al.*, J. Immunol. 162 (1999) 486-493
 Hoogenboom, H.R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388
 Hoshino, A., *et al.*, Eur. J. Immunol. 33 (2003) 861-869
 Humphreys, I.R., *et al.*, J. Exp. Med. 198 (2003) 1237-1242
 45 Idusogie, E.E., *et al.*, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184
 Imura, A., *et al.*, Blood 89 (1997) 2951-2958
 Imura, A., *et al.*, J. Exp. Med. 183 (1996) 2185-2195
 Ishii, N., *et al.*, Eur. J. Immunol. 33 (2003) 2372-2381
 Jakobovits, A., *et al.*, Nature 362 (1993) 255-258
 50 Jakobovits, A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555
 Jones, B., *et al.*, J. Immunol. 136 (1986) 348-356
 Jones, P., *et al.*, Nature 321 (1986) 522-525
 Kabat, E.A., *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National
 Institutes
 55 of Health, Bethesda, MD (1991)
 Kaufman, R.J., Mol. Biotechnol. 16 (2000) 151-161
 Kjaergaard, J., *et al.*, J. Immunol. 167 (2001) 6669-6677
 Kotani, A., *et al.*, Immunol. Lett. 84 (2002) 1-7
 Lane, P., J. Exp. Med. 191 (2000) 201-206
 60 Lonberg, N., and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. 25 (1995) 65-93
 Lonberg, N., *et al.*, Nature 368 (1994) 856-859
 Lonberg, N., Handbook of Experimental Pharmacology 113 (1994) 49-101
 Lukas, T.J., *et al.*, J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560

- Lund, J., *et al.* FASEB J. 9 (1995) 115-119
 Makrides, S.C., Protein Expr. Purif. 17 (1999) 183-202
 Mallett, S., and Barclay, A.N., Immunol. Today 12 (1991) 220-223
 Mallett, S., *et al.*, EMBO J. 9 (1990) 1063-1068
 5 Marks, J.D., *et al.*, J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597
 Matsumura, Y., *et al.*, J. Immunol. 163 (1999) 3007-3011
 Meissner, P., *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203
 Miura, S., *et al.*, Mol. Cell. Biol. 11 (1991) 1313-1325
 Morgan, A., *et al.*, Immunology 86 (1995) 319-324
 10 Morrison, S.L., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855
 Ndhlovu, L.C., *et al.*, J. Immunol. 167 (2001) 2991-2999
 Neuberger, M.S., EMBO J. 2 (1983) 1373-1378
 Neuberger, M.S., *et al.*, Nature 314 (1985) 268-270
 Nohara, C., *et al.*, J. Immunol. 166 (2001) 2108-2115
 15 Norderhaug, L., *et al.*, J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87
 Ohshima, Y., *et al.*, J. Immunol. 159 (1997) 3838-3848
 Orlandi, R., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837
 Picard, D., and Schaffner, W., Nature 307 (1984) 80-82
 Queen, C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033
 20 Ravetch, J.V., and Bolland, S., Annu. Rev. Immunol. 19 (2001) 275-290
 Ravetch, J.V., and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492
 Riechmann, L., *et al.*, Nature 332 (1988) 323-327
 Rogers, P.R., *et al.*, Immunity 15 (2001) 445-455
 Salek-Ardakani, S., *et al.*, J. Exp. Med. 198 (2003) 315-324
 25 Schlaeger, E.-J., and Christensen, K., Cytotechnology 30 (1999) 71-83
 Schlaeger, E.-J., J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199
 Shields, R.L., *et al.*, J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604
 Sojhr, H.T., and Bahl, O.P., Arch. Biochem. Biophys. 259 (1987) 52-57
 Stüber, E., and Strober, W., J. Exp. Med. 183 (1996) 979-989
 30 Stüber, E., *et al.*, Gastroenterology 115 (1998) 1205-1215
 Sugamura, K., *et al.*, Nat. Rev. Immunol. 4 (2004) 420-431
 Takahashi, Y., *et al.*, J. Virol. 75 (2001) 6748-6757
 Takasawa, N., *et al.*, Jpn. J. Cancer Res. 92 (2001) 377-382
 Tanaka, Y., *et al.*, Int. J. Cancer 36 (1985) 549-555
 35 Taylor, L., and Schwarz, H., J. Immunol. Meth. 255 (2001) 67-72
 Taylor, L., *et al.*, Int. Immunol. 6 (1994) 579-591
 Taylor, L., *et al.*, Nucleic Acids Res. 20 (1992) 6287-6295
 Thommesen, J.E., *et al.*, Mol. Immunol. 37 (2000) 995-1004
 Thotakura, N.R., and Bahl, O.P., Meth. Enzymol. 138 (1987) 350-359
 40 Tozawa, H., *et al.*, Int. J. Cancer 41 (1988) 231-238
 Tsukada, N., *et al.*, Blood 95 (2000) 2434-2439
 Tuailon, N., *et al.*, J. Immunol. 152 (1994) 2912-2920
 Tuailon, N., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 3720-3724
 45 US 4,179,337
 US 4,301,144
 US 4,496,689
 US 4,640,835
 US 4,670,417
 US 4,791,192
 50 US 5,202,238
 US 5,204,244
 US 5,545,806
 US 5,545,807
 US 5,569,825
 55 US 5,625,126
 US 5,633,425
 US 5,661,016
 US 5,770,429
 US 5,789,650
 60 US 5,814,318
 US 5,874,299
 US 5,877,397
 van de Winkel, J.G., and Anderson, C.L., J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524

- van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374
 Vitetta, E.S., *et al.*, *Science* 238 (1987) 1098-1104
 Ward, E.S., and Ghetie, V., *Ther. Immunol.* 2 (1995) 77-94
 5 Weinberg, A.D., *et al.*, *J. Immunol.* 162 (1999) 1818-1826
 Weinberg, A.D., *et al.*, *Nature Medicine* 2 (1996) 183-189
 Weinberg, A.D., *et al.*, *Semin. Immunol.* 10 (1998) 471-480
 Weinberg, A.D., *Trends Immunol.* 23 (2002) 102-109
 Werner, R.G., *et al.*, *Arzneimittelforschung* 48 (1998) 870-880
 10 WO 01/14424
 WO 87/05330
 WO 92/03918
 WO 92/22645
 WO 93/1227
 WO 94/11026
 15 WO 94/25585
 WO 95/12673
 WO 95/21915
 WO 98/24884
 WO 99/15200
 20 Wu, T., *et al.*, *Transplant. Proc.* 33 (2001) 217-218
 Yoshioka, T., *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 30 (2000) 2815-2823

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> ANTICUERPOS ANTI-OX40L

<130> 22672 WO

10 <150> EP 04022158
<151> 2004-09-17

<150> EP 04030546
<151> 2004-12-23

15 <160> 69

<170> Patent In versión 3.2

20 <210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> cadena ligera, región variable de LC.001, LC.059 y LC.063

<400> 1

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 Tyr
85 90 95

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

30 <210> 2
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

35

ES 2 433 916 T3

<220>

<223> cadena pesada, región variable de LC.001

<400> 2

5

```

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

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

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

Ser Ile Ile Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60

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

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

Ala Lys Asp Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
           100          105          110

Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser
           115           120
    
```

<210> 3

<211> 107

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera, región variable de LC.005

15

<400> 3

```

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

ES 2 433 916 T3

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

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

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

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

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

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

- <210> 4
- <211> 120
- <212> PRT
- <213> Artificial

5

- <220>
- <223> cadena pesada, región variable de LC.005

10 <400> 4

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

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

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Val
 50 55 60

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

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

ES 2 433 916 T3

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cadena ligera, región variable de LC.010

10

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> cadena pesada, región variable de LC.010

20

<400> 6

ES 2 433 916 T3

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

5 <210> 7
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cadena ligera, región variable de LC.029

<400> 7

ES 2 433 916 T3

Met Leu His Pro Leu Cys Lys Val Gly Ser His Gln Gly Ser Val Ala
 1 5 10 15

Val Asp Leu Gly Gln Ile Ser Leu Ser Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu
 20 25 30

Lys Ile Leu Gln Leu Ile Thr Val Asn Ser Ile Ile Val Ser Leu Thr
 35 40 45

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 50 55

<210> 8
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada, región variable de LC.029

10 <400> 8

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

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

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

ES 2 433 916 T3

<210> 9
<211> 57
<212> PRT
<213> Artificial

5
<220>
<223> cadena ligera, región variable de LC.019

10
<400> 9

Met Pro Pro Val Trp Lys Val Gly Ser His Gln Gly Ser Ala Ala Val
1 5 10 15

Asp Leu Gly Gln Ile Ser Leu Ser Pro Ser Ala Ala Cys Ser Leu Lys
20 25 30

Ile Leu Gln Leu Ile Thr Val Asn Ser Leu Ile Val Thr Leu Thr Phe
35 40 45

Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
50 55

15
<210> 10
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

20
<220>
<223> cadena pesada, región variable de LC.019

<400> 10

ES 2 433 916 T3

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

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

Thr Met_ His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Lys Asn Trp Ser Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

5 <210> 11
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> cadena ligera, región variable de LC.033 (a)

<400> 11

ES 2 433 916 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	Gly	Val	Ser	Arg	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	Val	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	Asp	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Gln	Tyr
				85					90					95	
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile						
			100					105							

- <210> 12
- <211> 121
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- 10 <223> cadena pesada, región variable de LC.033

<400> 12

ES 2 433 916 T3

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

5 <210> 13
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> cadena ligera, región constante
<400> 13

ES 2 433 916 T3

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> 14
- 5 <211> 330
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- 10 <223> cadena pesada, región constante (gamma 1)
- <400> 14

ES 2 433 916 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

ES 2 433 916 T3

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> 15
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>

<223> cadena pesada, región constante (gamma 4)

5 <400> 15

ES 2 433 916 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

ES 2 433 916 T3

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

- <210> 16
- <211> 104
- <212> PRT
- <213> Artificial

5

- <220>
- <223> cadena ligera, región variable de LC.033 (b)

10 <400> 16

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

ES 2 433 916 T3

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 Thr Phe
85 90 95

Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100

<210> 17
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> cadena pesada, región variable de LC.059

10

<400> 17

ES 2 433 916 T3

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

<210> 18
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cadena ligera, región variable de LC.060

10 <400> 18

ES 2 433 916 T3

Ala Ile Gln Leu 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 Ala
 20 25 30

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

Tyr Asp Val Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Trp Thr
 85 90 95

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

<210> 19
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> cadena pesada, región variable de LC.060

10

<400> 19

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

ES 2 433 916 T3

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

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

Ser Leu Ile Ser Gly Ser Gly Gly Leu Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 120
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> cadena pesada, región variable de LC.063
<400> 20

ES 2 433 916 T3

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

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

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

Ser Ile Ile Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Arg Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Lys Asp Asp Ile Pro Ala Ala Gly Thr Phe Asp Pro Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> CDR / fragmento de anticuerpo
 <400> 21

Ser Tyr Thr Met His
 1 5

15 <210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> CDR / fragmento de anticuerpo
 <400> 22

ES 2 433 916 T3

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

5 <210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

10 <400> 23

Asn Phe Gly Met His
1 5

15 <210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

20 <400> 24

Asn Tyr Gly Met His
1 5

25 <210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

30 <400> 25

Ser Tyr Ala Met Asn
1 5

35 <210> 26
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

40 <400> 26

Ile Ile Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

45 <210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
 <223> CDR / fragmento de anticuerpo

5 <400> 27

Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 28
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> CDR / fragmento de anticuerpo

15 <400> 28

Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ala Tyr Tyr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 29
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> CDR / fragmento de anticuerpo

25

<400> 29

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 30
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> CDR / fragmento de anticuerpo

35

<400> 30

Val Ile Trp Asn Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 31

ES 2 433 916 T3

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> CDR / fragmento de anticuerpo
 <400> 31

Ile Ile Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly Arg

10 <210> 32
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> CDR / fragmento de anticuerpo
 <400> 32

20 Leu Ile Ser Gly Ser Gly Gly Leu Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly Arg

25 <210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> CDR / fragmento de anticuerpo
 <400> 33

Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

35 <210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> CDR / fragmento de anticuerpo
 <400> 34

Asp Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr Phe Asp Tyr
 1 5 10

45 <210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 433 916 T3

<220>
 <223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 35

5 Lys Asn Trp Ser Phe Asp Phe
 1 5

<210> 36
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 36

15 Asp Arg Met Gly Ile Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
 1 - 5 10

<210> 37
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 37

25 Lys Asp Asp Ile Pro Ala Ala Gly Thr Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 38

35 Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> CDR / fragmento de anticuerpo

45 <400> 39

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 40
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>

ES 2 433 916 T3

<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 40

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

5 <210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 41

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

15 <210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 42

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

25 <210> 43
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 43

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

35 <210> 44
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial

40 <223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 44

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
1 5 10 15

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala
20

45 <210> 45
<211> 7
<212> PRT

ES 2 433 916 T3

<213> Artificial

<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

5
<400> 45

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

10
<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

15
<400> 46

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

20
<220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

25
<400> 47

Met Pro Pro Val Trp Lys Val
1 5

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

30
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

35
<400> 48

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

40
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

45
<400> 49

Leu His Pro Leu Cys Lys Val
1 5

<210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

50
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

ES 2 433 916 T3

<400> 50

Asp Val Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

5 <210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 51

Asn Ser Leu Ile Val Thr Leu Thr
1 5

15 <210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 52

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

20 <210> 53
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 53

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe Thr
1 5

30 <210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 54

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Gln Tyr Thr
1 5

40 <210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 55

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Thr
1 5

50 <210> 56
<211> 8

ES 2 433 916 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 56
Asn Ser Ile Ile Val Ser Leu Thr
1 5

10 <210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> CDR / fragmento de anticuerpo

<400> 57

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Trp Thr Phe
1 5

20 <210> 58
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> cadena pesada de LC.001 (de tipo IgG1 humana)
<400> 58

ES 2 433 916 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 433 916 T3

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

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

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

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

Gly Lys
 450

<210> 59

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada de LC.001 (mutante L234A, L235A de IgG1 humana)

10 <400> 59

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

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

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

Ser Ile Ile Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

ES 2 433 916 T3

Ala Lys Asp Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 433 916 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
 450

<210> 60
 <211> 447
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena pesada de LC.001 (mutante S228P de IgG4 humana)

10 <400> 60

ES 2 433 916 T3

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

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

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

ES 2 433 916 T3

Ser Ile Ile Ser Gly Ser Gly Gly Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Arg Leu Val Ala Pro Gly Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 61
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>

<223> cadena ligera de LC.001

<400> 61

ES 2 433 916 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 Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln 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

ES 2 433 916 T3

- <210> 62
- <211> 450
- <212> PRT
- 5 <213> Artificial

- <220>
- <223> cadena pesada de LC.005 (tipo IgG1 humana)

- 10 <400> 62

ES 2 433 916 T3

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

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

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

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

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

ES 2 433 916 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 433 916 T3

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 63

<211> 450

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada de LC.005 (mutante L234A, L235A de IgG1 humana)

10 <400> 63

ES 2 433 916 T3

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

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

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 433 916 T3

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
450

<210> 64

<211> 447

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> cadena pesada de LC.005 (mutante S228P de IgG4 humana)

10 <400> 64

ES 2 433 916 T3

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

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

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly His Asp Lys Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Val
50 55 60

ES 2 433 916 T3

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

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

Ala Arg Asp Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

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

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

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

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

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

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

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

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

ES 2 433 916 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 65
 <211> 214
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> cadena ligera de LC.005

5

<400> 65

ES 2 433 916 T3

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

ES 2 433 916 T3

<210> 66
<211> 449
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> cadena pesada de LC.060 (de tipo IgG1 humana)

<400> 66

ES 2 433 916 T3

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

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

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

Ser Leu Ile Ser Gly Ser Gly Gly Leu Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp 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 2 433 916 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

ES 2 433 916 T3

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> 67

<211> 449

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> heavy chain LC.060 (L234A, L235A human IgG1 mutant)

<400> 67

ES 2 433 916 T3

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

ES 2 433 916 T3

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 Ala Ala 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

ES 2 433 916 T3

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> 68
<211> 446
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> cadena pesada de LC.060 (mutante S228P de IgG4 mutante)

10 <400> 68

ES 2 433 916 T3

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

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

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

ES 2 433 916 T3

Ser Leu Ile Ser Gly Ser Gly Gly Leu Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Asp Ile Leu Val Thr Gly Ala Leu Asp 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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
195 200 205

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

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

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

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

ES 2 433 916 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 69
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>

<223> cadena ligera de LC.060

<400> 69

ES 2 433 916 T3

Ala Ile Gln Leu 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 Ala
 20 25 30

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

Tyr Asp Val Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Trp Thr
 85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo de unión a OX40L humano, caracterizado porque el anticuerpo comprende CDR de entre las CDR de cadena ligera (V_L) de secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 y las CDR variables de cadena pesada (V_H) de SEC ID nº 2.
- 10 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende el dominio variable de cadena ligera definido por la secuencia de aminoácidos SEC ID nº 1 y el dominio variable de cadena pesada definido por SEC ID nº 2.
- 15 3. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa según se define en SEC ID nº 13 ó la región constante de cadena ligera de SEC ID nº 61.
- 20 4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el anticuerpo comprende una región constante pasada según se define en SEC ID nº 14 ó en SEC ID nº 58, nº 59 ó nº 60.
- 25 5. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la región constante de cadena ligera kappa del mismo se define en SEC ID nº 61 y la región constante pesada del mismo se define en SEC ID nº 58, nº 59 ó nº 60.
- 30 6. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado porque es producido por la línea celular hu-mAb<hOX40L>LC.001.
- 35 7. Anticuerpo que es un fragmento Fab, $F(ab')_2$ o un fragmento de cadena sencilla de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y que se une a OX40L humano.
- 40 8. Molécula de ácidos nucleicos codificante de una molécula de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 45 9. Vector que comprende la molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 8.
10. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 9.
11. Método para la preparación de una molécula de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 10 bajo condiciones que permiten la síntesis de dicha molécula de anticuerpo y recuperar dicha molécula de anticuerpo a partir de dicho cultivo.
12. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.
13. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la utilización en la profilaxis y tratamiento de trastornos inflamatorios.
14. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la preparación de un medicamento destinado a la profilaxis y tratamiento de trastornos inflamatorios.

Fig. 1a

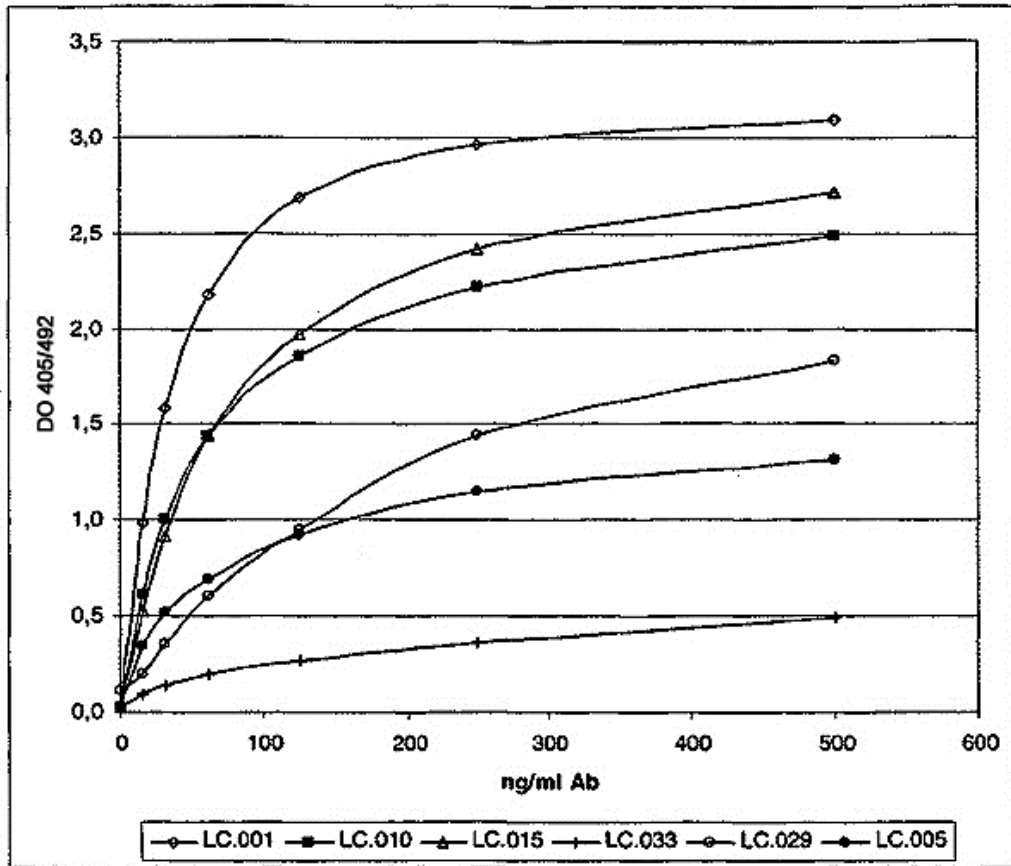


Fig. 1b

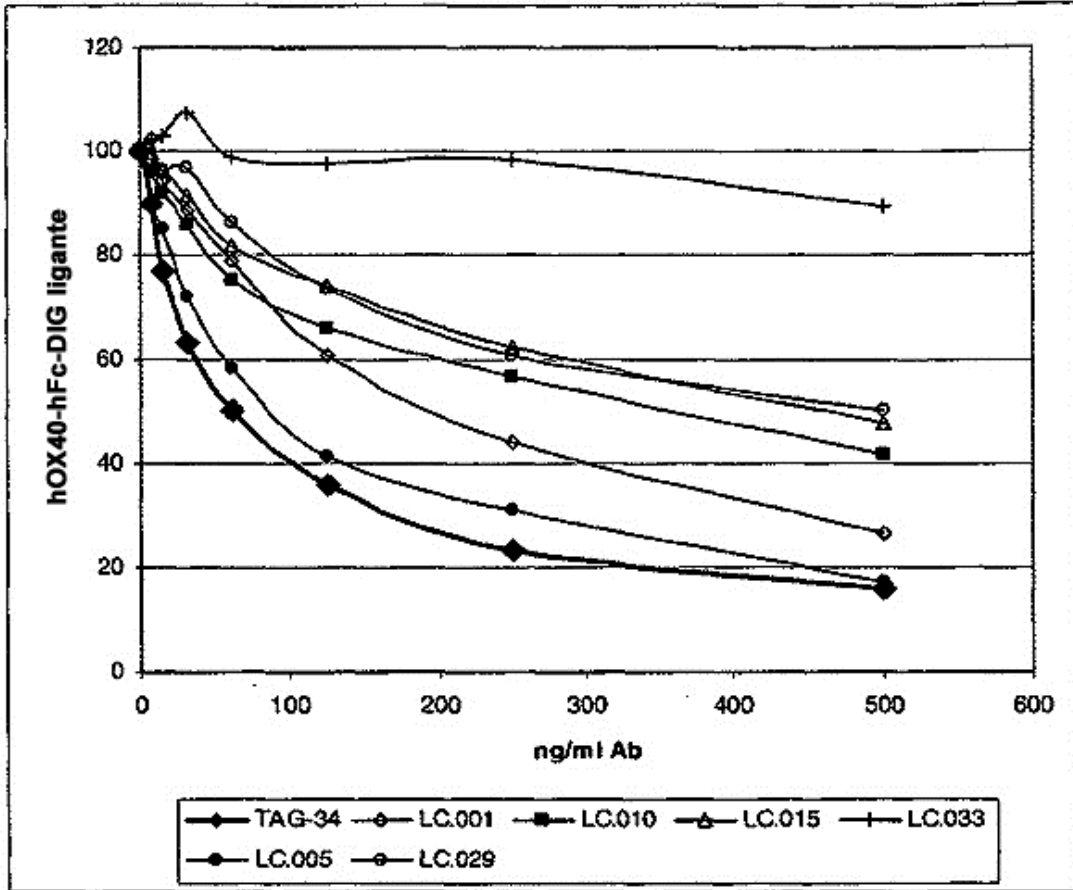


Fig. 2

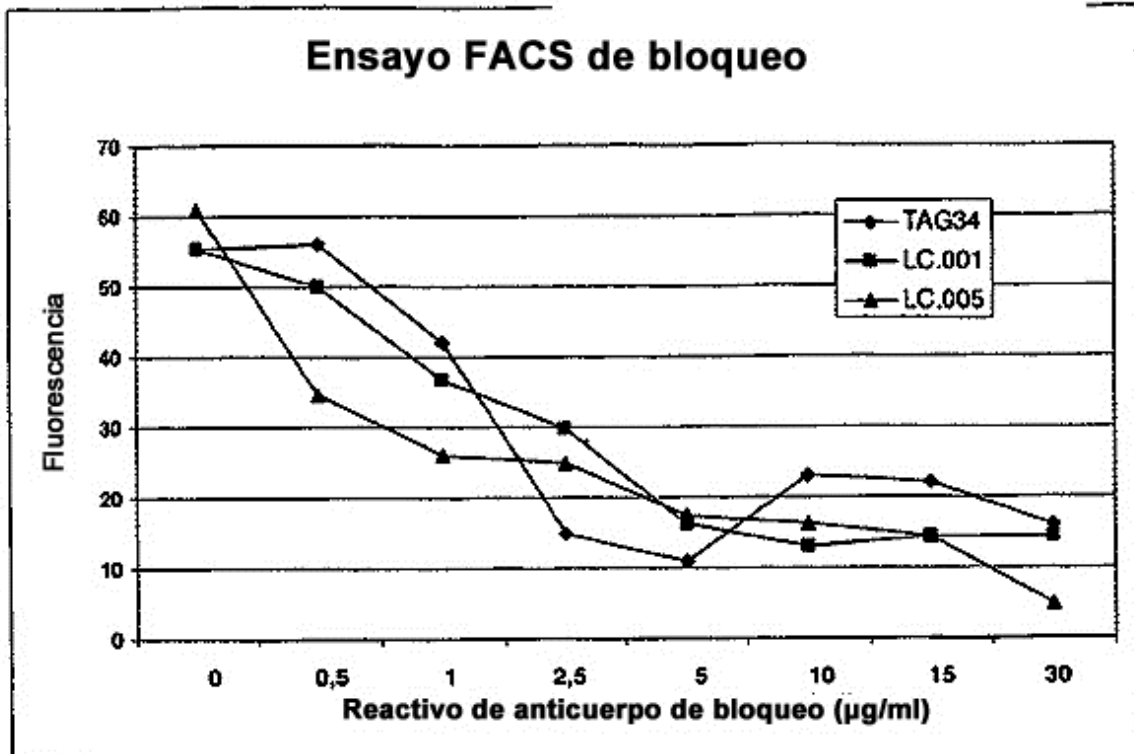


Fig. 3

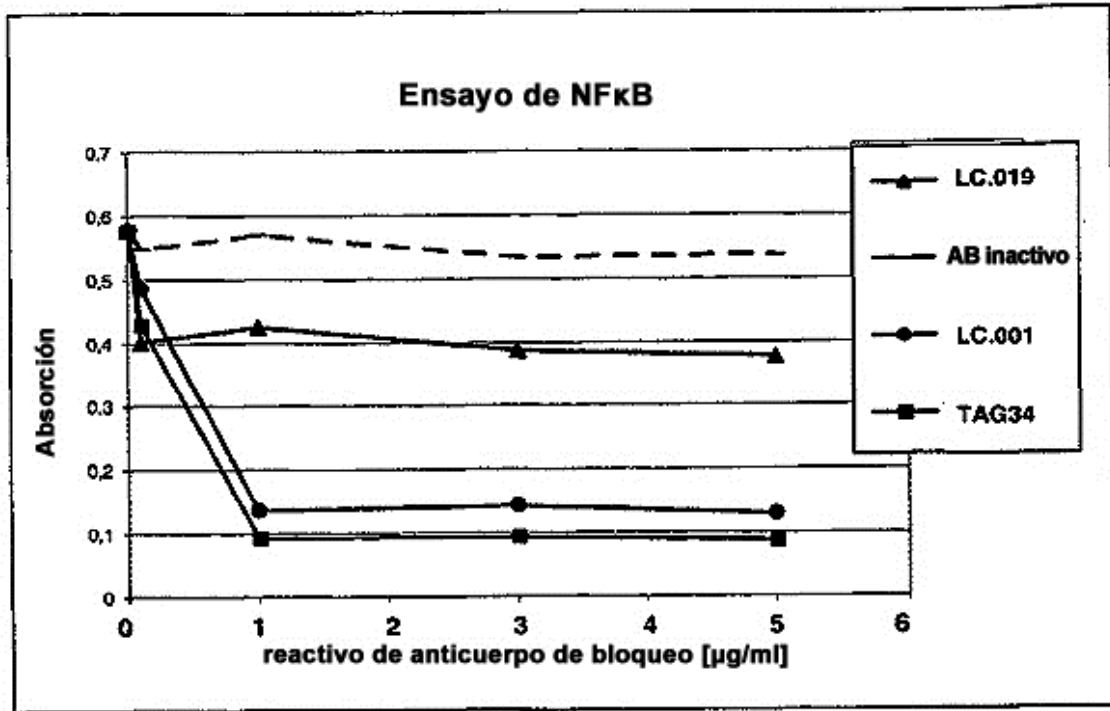


Fig. 4

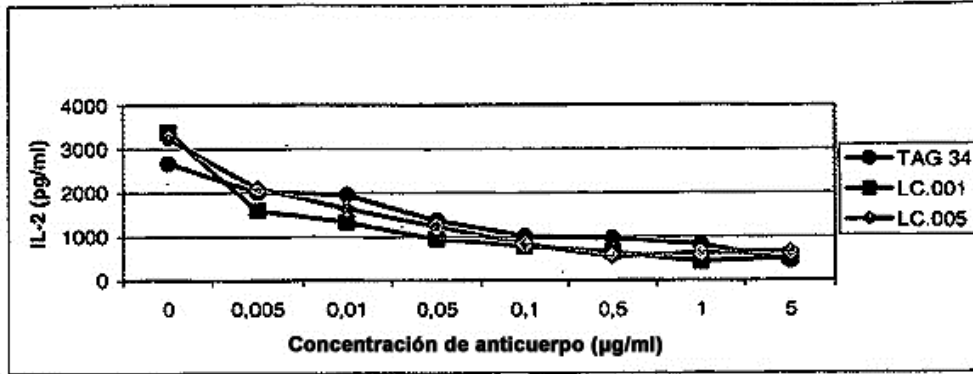


Fig. 5

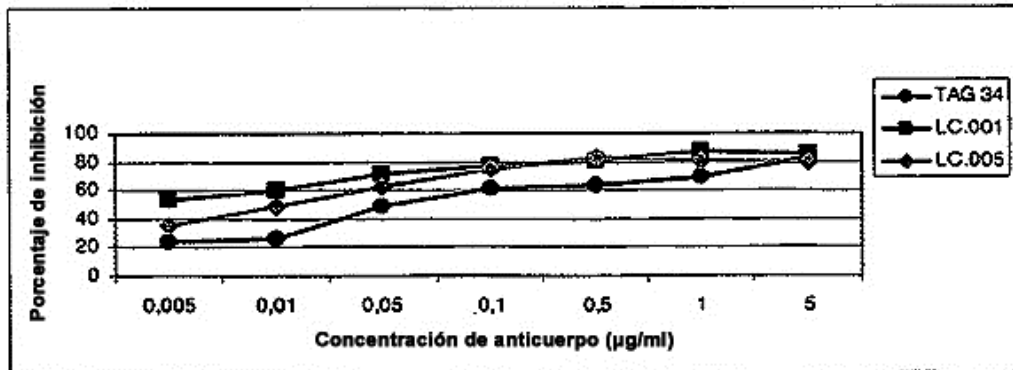


Fig. 6

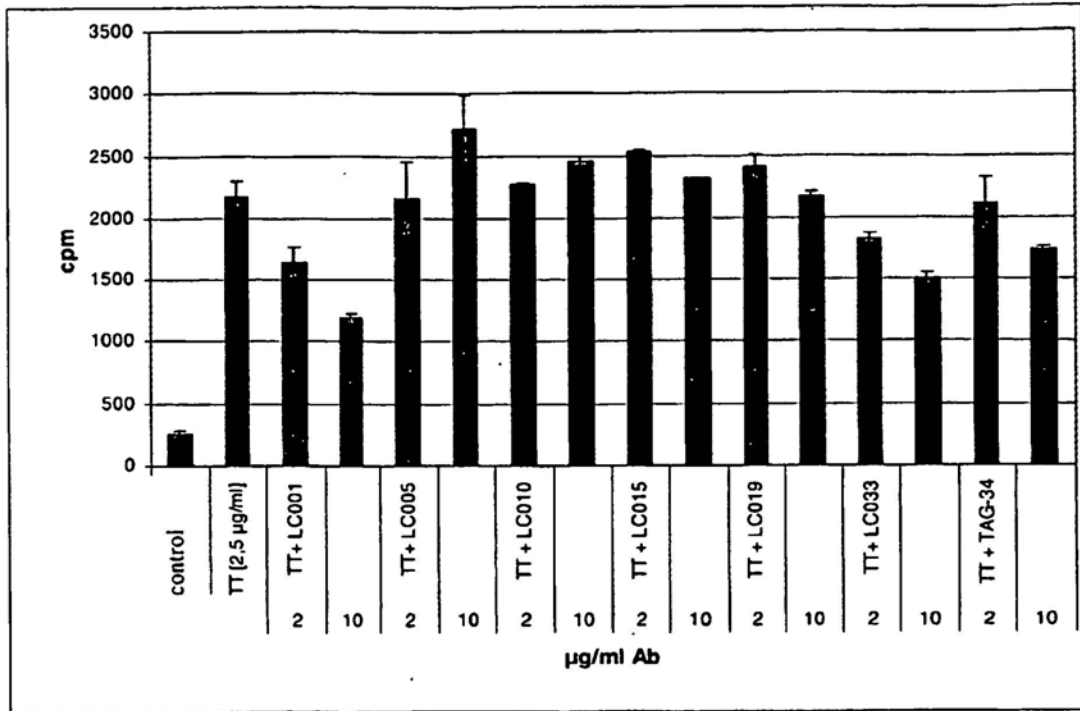


Fig. 7

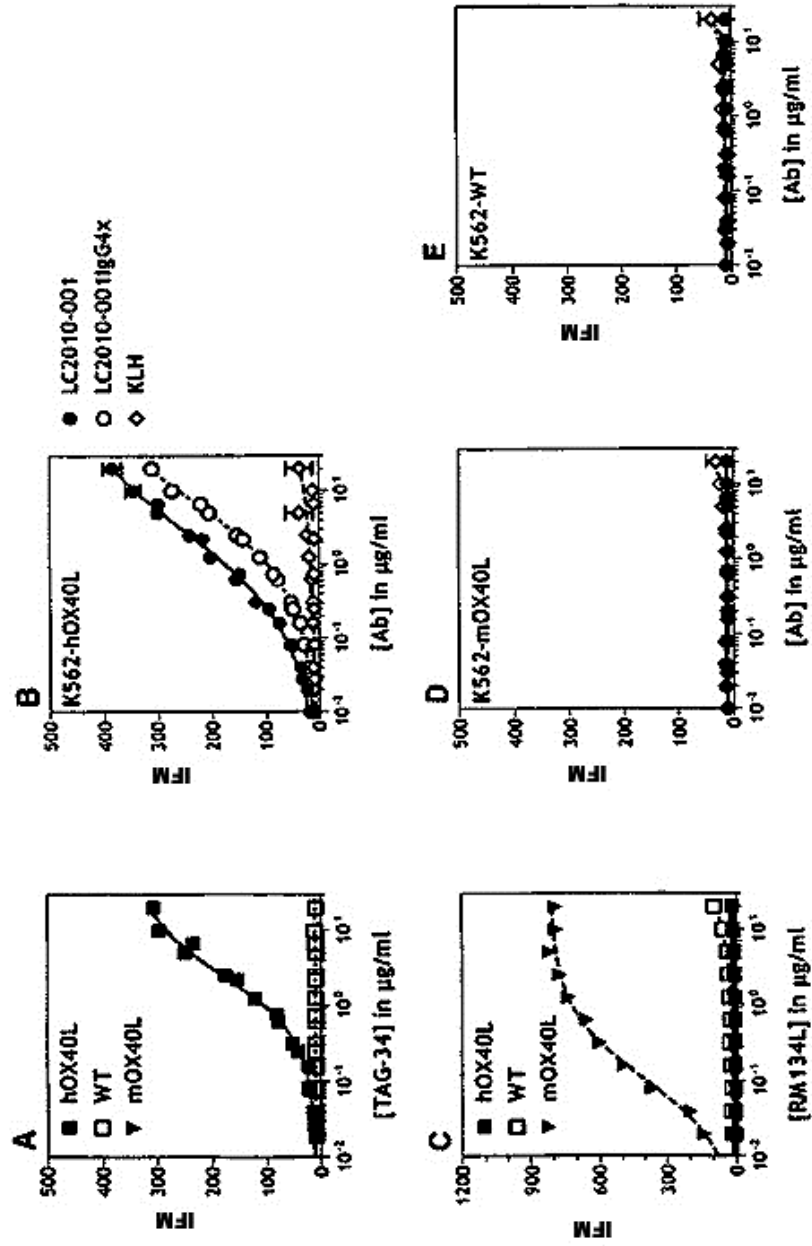


Fig. 8

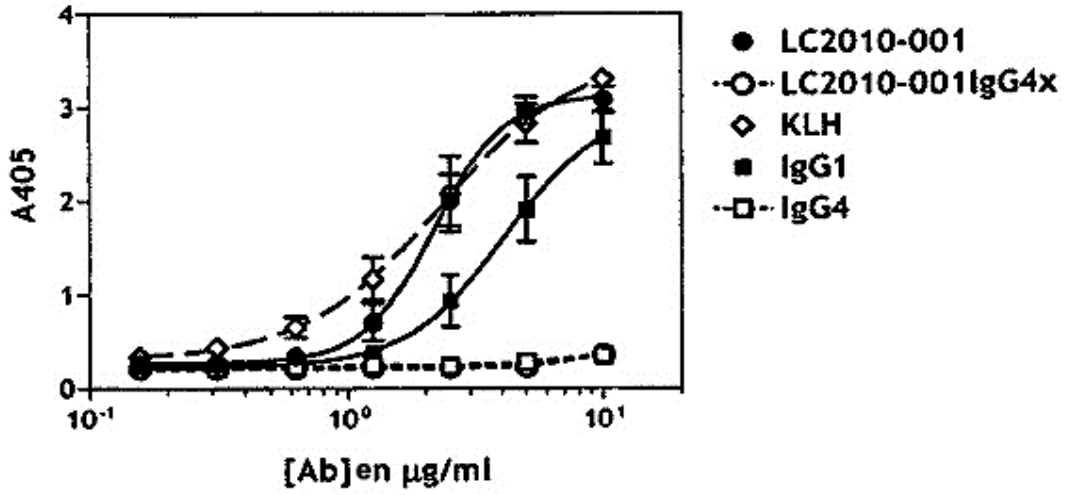


Fig. 9

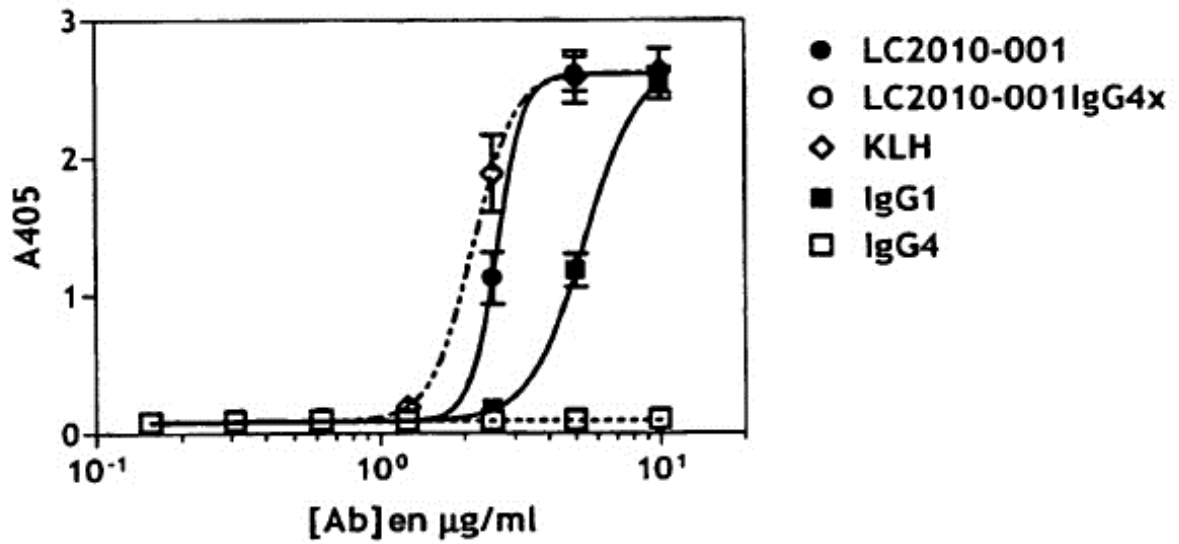


Fig. 10

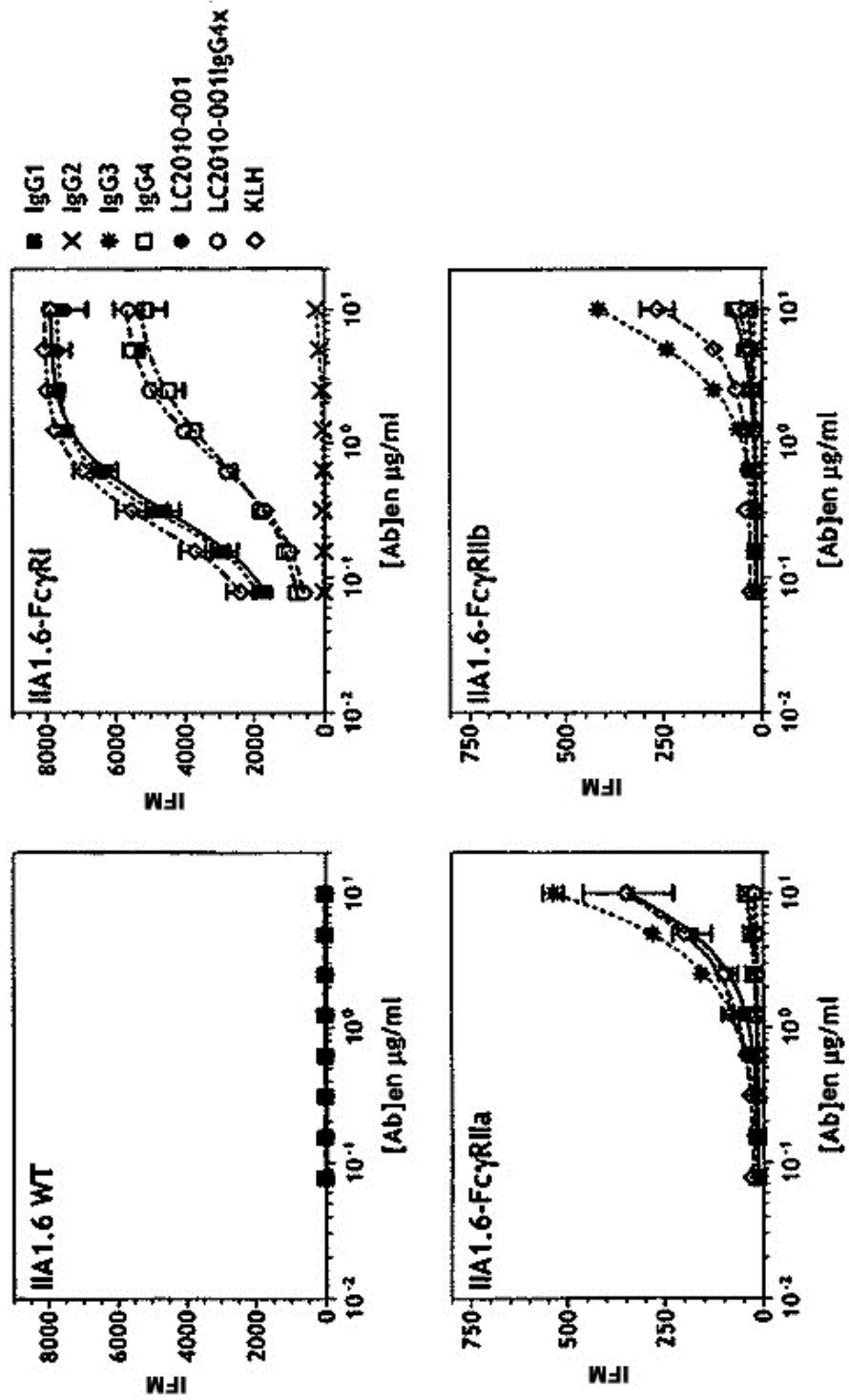


Fig. 11

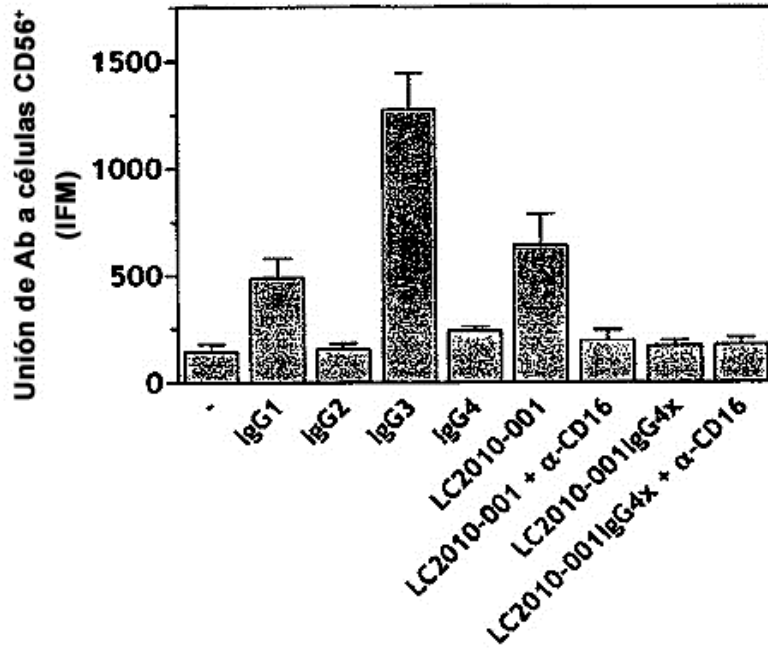


Fig. 12

