

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 994**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2007 E 10172151 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013 EP 2292663**

54 Título: **Anticuerpos antagonistas monoclonales humanos específicos de LIGHT humano**

30 Prioridad:

28.08.2006 US 840774 P
25.01.2007 US 897875 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2014

73 Titular/es:

KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (50.0%)
1-6-1, Ohtemachi Chiyoda-ku
Tokyo 100-8185, JP y
LA JOLLA INSTITUTE FOR ALLERGY AND
IMMUNOLOGY (50.0%)

72 Inventor/es:

GRANGER, STEVEN W.;
KATO, SHINICHIRO y
WARE, CARL F.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 439 994 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 antagonistas monoclonales humanos específicos de LIGHT humano

5 **Introducción**

En el presente documento se proporcionan anticuerpos que se unen de forma inespecífica a un polipéptido LIGHT humano (hLIGHT) (de tipo linfotóxica, presenta expresión inducible y compite con glicoproteína D de HSV para HVEM, un receptor expresado por linfocitos T), un fragmento de polipéptido de hLIGHT u otro epítipo de hLIGHT. En algunas realizaciones los anticuerpos son anticuerpos totalmente humanos, preferentemente anticuerpos monoclonales totalmente humanos, que se unen de forma inespecífica a un polipéptido de hLIGHT, fragmento de polipéptido de hLIGHT o epítipo de hLIGHT. Además se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican anticuerpos que se unen de forma inespecífica a un polipéptido de un polipéptido de hLIGHT, fragmento de polipéptido de hLIGHT, o epítipo de hLIGHT. La invención también proporciona vectores y células huésped que comprenden ácidos nucleicos que codifican anticuerpos que se unen de forma inespecífica a un polipéptido de hLIGHT, fragmento de polipéptido de hLIGHT, o epítipo de hLIGHT, así como procedimientos para preparar anticuerpos que se unen de forma inespecífica a un polipéptido de hLIGHT, fragmento de polipéptido de hLIGHT, o epítipo de hLIGHT. Además se proporcionan procedimientos para usar los anticuerpos anti-hLIGHT que se proporcionan en el presente documento para inhibir la actividad biológica de hLIGHT *in vivo* y/o para tratar o dirigir de otro modo una enfermedad mediada por hLIGHT en un paciente.

Antecedentes

LIGHT, (de tipo linfotóxica, presenta una expresión inducible y compite con la glicoproteína D de HSV para HVEM, un receptor expresado por linfocitos T) es una diana potencial de citoquinas que se ha implicado en los procedimientos de enfermedades autoinmunes inflamatorias crónicas (Mauri y col. 1998 *Immunity* 8 21-30). Como un miembro de la superfamilia de ligandos del TNF (TNFSF), LIGHT también se conoce como TNFSF14 o CD258. LIGHT se expresa en la superficie de linfocitos T después de la activación de una forma estrictamente regulada apareciendo a las 4 horas, tiene un pico a las 12-24 horas y desapareciendo hacia las 48 horas (Castellano y col. 2002 *J Biol Chem* 277 42841-51). Sin embargo, LIGHT también está presente en niveles detectables de forma constitutiva sobre la superficie de células dendríticas inmaduras (Tamada y col. 2000 *J Immunol* 164 4105-10) y sobre linfocitos T y linfocitos citotóxicos naturales (NK) del intestino (Cohavy y col. 2005 *J Immunol* 174 646-53). LIGHT media sus efectos biológicos mediante la unión a tres subreceptores de la superfamilia del TNF que incluyen el receptor de linfotóxica β (LT β R) (Crowe y col. 1994 *Science* 264 707-10, Browning y col. 1997 *J Immunol* 159 3288-98), el mediador de la entrada del virus del herpes (HVEM) (Montgomery y col. 1996 *Cell* 87 (3) 427-36), y el receptor señuelo 3 (DcR3) (Yu y col. 1999 *J Biol Chem* 274 13733-6).

Ratones tratados con una proteína de fusión LT β R-Fc inhibitoria redujeron los síntomas de inflamación en el modelo de transferencia de linfocitos T de tipo CD4+CD45RB^{high} de la colitis, una patología mediada por linfocitos T de tipo CD4+ (Mackay y col. 1998 *Gastroenterology* 115 1464-75). También se ha mostrado que la expresión específica constitutiva de linfocitos T transgénicos de LIGHT se dirige a la inflamación grave del intestino con patología de tipo autoinmune que se asemeja a la enfermedad inflamatoria del intestino humano (IBD) (Wang y col. 2005 *J Immunol* 174 8173-82, Shaikh y col. 2001 *J Immunol* 167 6330-7, Wang y col. 2001 *J Immunol* 167 5099-105, Wang y col. 2004 *J Clin Invest* 113 826-35). Los linfocitos que expresan LIGHT pueden inducir síntomas de tipo IBD (*por ejemplo*, perfiles de citoquinas de la enfermedad de Crohn humana, úlceras de fisuración, ileitis, y aumentos en el IFN- γ y TNF del colon) cuando células de los nódulos linfáticos mesentéricos a partir de animales transgénicos con LIGHT se transfieren a RAG-/- (Wang y col. 2005 *J Immunol* 174 8173-82). En la enfermedad humana, se observaron aumentos de la expresión de LIGHT en pacientes con enfermedad de Crohn activa (Cohavy y col. 2005 *J Immunol* 174 646-53, Wang y col. 2005 *J Immunol* 174 8173-82, Wang y col. 2004 *J Clin Invest* 113 826-35, Cohavy y col. 2004 *J Immunol* 173 251-8). También se ha demostrado que LIGHT está elevada en linfocitos T del intestino de pacientes con IBD (Cohavy y col. 2004 *J Immunol* 173 251-8). La evidencia genética también apoya un papel para LIGHT en la IBD (Granger y col. 2001 *J Immunol* 167 5122-8); (Rioux y col. 2000 *Am J Hum Genet* 66 1863-70; Low y col. 2004 *Inflamm Bowel Dis* 10 173-81; Bonen y Cho 2003 *Gastroenterology* 124 521-36).

Además, se ha mostrado que la señalización de CCL20-CCR6 está implicada en la IBD, y LIGHT induce la secreción de CCL20 desde la línea celular epitelial HT29.14s del colon humano. En estudios en seres humanos, se ha encontrado que las células epiteliales del colon son una fuente principal de CCL20 en pacientes con IBD y la expresión de CCL20 está aumentada en pacientes con IBD humana (Kwon y col. 2002 *Gut* 51 818-26; (Kaser y col. 2004 *J Clin Immunol* 24 74-85).

hLIGHT también se ha implicado en la enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD). Por ejemplo, se ha mostrado que LIGHT proporciona potente actividad coestimuladora para linfocitos T, potenciado la proliferación y la producción de citoquinas Th1 independientes de la vía de B7-CD28 (véase, *por ejemplo*, Tamada y col. 2000 *J. Immunol.* 164 4105-4110). El bloqueo de la coestimulación de LIGHT-HVEM mediante anticuerpos monoclonales anti-HVEM, HVEM-Ig, o la proteína de fusión LT β R inhibe respuestas alogénicas de los linfocitos T (véase, *por ejemplo*, Tamada y col. 2000 *J. Immunol.* 164 4105-4110, Harrop y col. 1999 *J. Immunol.* 161 1786). Además, la administración *in*

vivo de anticuerpos de LTβR-Ig o de anti-LIGHT de murino inhibe respuestas de linfocitos T citotóxicos anti-huésped (CTL) en un modelo murino de GVHD aguda (Tamada y col. 2000 Nat. Med. 6 283-289).

5 Aunque observaciones tales como las que se han analizado anteriormente indican un papel para LIGHT en trastornos inflamatorios, tales como IBD o GVHD, hasta la fecha no se han producido anticuerpos humanos de LIGHT anti-humano, ni se ha mostrado que ningún anticuerpo anti-hLIGHT humano o anticuerpos anti-hLIGHT monoclonales sean antagonistas de la actividad biológica de hLIGHT. El documento WO 03/089 575 analiza anticuerpos anti-LIGHT teóricamente, pero en realidad no se producen anticuerpos ni se someten a ensayo. Como tal, sigue existiendo una necesidad para la identificación de terapias, tales como terapias anti-LIGHT, útiles para el tratamiento de trastornos inflamatorios en seres humanos. La mención o el análisis de una referencia en el presente documento no se interpretará como una admisión de que éste es técnica anterior a la presente invención.

Sumario

15 La invención se expone en las reivindicaciones.

En particular, en el presente documento se proporciona:

20 [1] Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo de hLIGHT en donde el anticuerpo comprende

A. (a) una VH de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC; y (b) un VL de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC, o B. un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo de hLIGHT, en donde el anticuerpo comprende:

(a) una CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC ; y (b) una CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC .

[2] El anticuerpo de [1], en donde el anticuerpo aislado es un anticuerpo producido por el hibridoma con N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC .

35 [3] El anticuerpo de [1], en donde el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4; y (b) una región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEC ID N°: 90, 91 o 92.

40 [4] El anticuerpo de [1], en donde el anticuerpo comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende:
45 (1) una CDR1 de VH de SEC ID N°: 20; (2) una CDR2 de VH de SEC ID N°: 21; y (3) una CDR3 de VH de SEC ID N°: 22; y

(b) una región variable de cadena ligera que comprende un VL seleccionado entre el grupo que consiste en:
50 (1) una CDR1 de VL de SEC ID N°: 93, una CDR2 de VL de SEC ID N°: 96 y una CDR3 de VL de SEC ID N°: 99;
(2) una CDR1 de VL de SEC ID N°: 94, una CDR2 de VL de SEC ID N°: 97 y una CDR3 de VL de SEC ID N°: 100; y
55 (3) una CDR1 de VL de SEC ID N°: 95, una CDR2 de VL de SEC ID N°: 98 y una CDR3 de VL de SEC ID N°: 101.

[5] El anticuerpo de uno cualquiera de [1]-[4], en donde el anticuerpo comprende un dominio constante de IgG.

60 [6] El anticuerpo de uno cualquiera de [1]-[5], en donde el anticuerpo comprende un dominio constante de IgG1 o de IgG4.

[7] El anticuerpo de uno cualquiera de [1]- [6], en donde el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, o en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado, o en donde el anticuerpo es un fragmento de unión a antígeno, o en donde el anticuerpo es un fragmento de Fab, fragmento de F (ab') 2, Fv de una sola cadena (sFv), fragmento

divalente, fragmento trivalente, o minicuerpo.

[8] El anticuerpo de uno cualquiera de [1]-[7], en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo recombinante.

5

[9] Una composición que comprende el anticuerpo de uno cualquiera de [1] a [8].

[10] Una molécula aislada de ácido nucleico

10 (i) que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica (a) una secuencia de aminoácidos de VH de un anticuerpo producido por un hibridoma depositado con N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC; y (b) una secuencia de aminoácidos de VL de un anticuerpo producido por un hibridoma depositado con N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC , o

15 (ii) que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica (a) una CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC ; y (b) una CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC , o

20 (iii) que comprende o que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo producido por un hibridoma depositado con N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC , o

(iv) que comprende (a) una secuencia representada en la SEC ID N°: 44; y (b) una secuencia representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 104, 105 o 106.

25

[11] Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de [10].

[12] Una célula huésped que comprende el vector de [11].

30 [13] Un método para producir el anticuerpo de uno cualquiera de [1] a [8], comprendiendo el método cultivo de la célula huésped de [12] en condiciones que promueven la producción del anticuerpo.

[14] Un hibridoma que produce un anticuerpo tal como se reivindica en uno cualquiera de [1] a [8].

35

[15] El hibridoma de [14], el hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC .

[16] Un kit que comprende el anticuerpo de uno cualquiera de [1] a [8] o la composición de [9].

40 En el presente documento se proporcionan anticuerpos, tales como anticuerpos totalmente humanos, que se unen de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. Además se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican anticuerpos, tales como anticuerpos totalmente humanos, que se unen de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. Además se proporcionan vectores y células huésped que comprenden ácidos nucleicos que codifican anticuerpos, tales como anticuerpos totalmente humanos, que se unen de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. Además se proporcionan métodos para preparar anticuerpos, tales como anticuerpos totalmente humanos, que se unen de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. Además, en el presente documento se proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por hLIGHT que comprende administrar un anticuerpo, tal como un anticuerpo totalmente humano, que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. En realizaciones precedentes, anticuerpos anti-hLIGHT proporcionados en el presente documento son anticuerpos antagonistas que mejoran, neutralizan o inhiben de otro modo la actividad biológica de hLIGHT *in vivo* (por ejemplo, la producción o secreción mediada por hLIGHT de CCL20, IL-8 o RANTES a partir de células que expresan un ligando de hLIGHT, tal como un receptor de hLIGHT, (por ejemplo, HVEM, LTβR y/o DcR3)). Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo de longitud total o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno. Los anticuerpos de la invención también son útiles para detectar hLIGHT, así como para mejorar, neutralizar o inhibir de otro modo la actividad de hLIGHT, por ejemplo, en un sujeto humano que padece un trastorno en el que la actividad de hLIGHT es perjudicial.

60 Por lo tanto, en el presente documento se proporciona un anticuerpo aislado que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT (por ejemplo, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble), un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. El anticuerpo se puede unir de forma inmuno-específica a (a) un epítipo de hLIGHT trimérico (o nativo), (b) a un epítipo de hLIGHT monomérico (o desnaturalizado), (c) tanto a un epítipo de hLIGHT trimérico como a un epítipo de hLIGHT monomérico, (d) un epítipo de hLIGHT trimérico pero no a un epítipo de hLIGHT monomérico, o (e) un epítipo de hLIGHT monomérico pero no a un epítipo de hLIGHT trimérico. Preferentemente, el anticuerpo se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT trimérico pero

65

no a un epítipo de hLIGHT monomérico humano. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo E1, anticuerpo E13, anticuerpo E63, anticuerpo F19, o anticuerpo F23.

5 Hibridomas que producen cada uno de los anticuerpos E1, E13, E63, F19 y F23 se depositaron bajo las disposiciones del Tratado de Budapest con la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209) el 12 de julio de 2006 (Nº de Acceso PTA-7729 de la ATCC (hibridoma 124 E1) y Nº PTA-7728 (hibridoma 124 F23), respectivamente), y 17 de agosto de 2006 (Nº de Acceso PTA-7818 de la ATCC (hibridoma 124 E63) y Nº PTA-7819 (hibridoma 124 F19) y 23 de agosto de 2006 (Nº de Acceso PTA-7842 de la ATCC (hibridoma 124 E13). Los anticuerpos producidos por cada uno de los hibridomas 124 E1, 124 E13, 124 E63, 10 124 F19 y 124 F23 también se pueden denominar en el presente documento E1, E13, E63, F19, F23, respectivamente, y/o mediante Nº de Acceso PTA-7729 de la ATCC, Nº PTA-7842, Nº PTA-7818, Nº PTA-7819, y Nº PTA-7728, respectivamente.

15 Estos anticuerpos, hibridomas, métodos de preparación de estos anticuerpos, y métodos de uso de estos anticuerpos están todos incluidos en la presente divulgación.

Un anticuerpo de la presente divulgación puede ser uno que esté bloqueado de forma competitiva (*por ejemplo*, de una manera dependiente de la dosis) por un anticuerpo E1, un anticuerpo E13, y/o un anticuerpo E63 para su unión a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble), un fragmento de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. El anticuerpo puede estar bloqueado de forma competitiva (*por ejemplo*, de una manera dependiente de la dosis) por un anticuerpo F19 y/o un anticuerpo F23 para su unión a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble), un fragmento de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. El anticuerpo puede estar bloqueado de forma competitiva (*por ejemplo*, de una manera dependiente de la dosis) por un anticuerpo E1, un anticuerpo E13 y/o un anticuerpo E63, pero no está bloqueado de forma competitiva (*por ejemplo*, de una manera dependiente de la dosis) por un anticuerpo F19 y/o un anticuerpo F23, para su unión a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble), un fragmento de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. El anticuerpo puede estar bloqueado de forma competitiva (*por ejemplo*, de una manera dependiente de la dosis) por un anticuerpo F19 y/o un anticuerpo F23, pero no está bloqueado de forma competitiva (*por ejemplo*, de una manera dependiente de la dosis) por un anticuerpo E1, un anticuerpo E13 y/o un anticuerpo E63, para su unión a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble), un fragmento de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. En los Ejemplos en el presente documento se proporcionan ensayos de bloqueo competitivo a modo de ejemplo.

35 En el presente documento también se proporcionan anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo que se une a antígenos de los mismos que se unen de forma inespecífica a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble), un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. El anticuerpo fragmento de unión al antígeno puede comprender una cadena de VH, cadena de VL, dominio de VH, dominio de VL, CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de E1, E13, E63, F19 o F23.

40 El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender menos de seis CDR. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender o consiste en uno, dos, tres, cuatro, o cinco CDR seleccionadas entre el grupo que consiste en CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender o consiste en uno, 45 dos, tres, cuatro, o cinco CDR seleccionadas entre el grupo que consiste en CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de E1, E13, E63, F19 o F23.

50 Además, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo anti-hLIGHT de la presente divulgación, tal como E1, E13, E63, F19 o F23.

Un anticuerpo que se describe en el presente documento puede ser un anticuerpo totalmente humano, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo antagonista, o cualquier combinación de los mismos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, o fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une de forma inespecífica a hLIGHT. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo antagonista.

60 El anticuerpo puede competir (*por ejemplo*, en una manera dependiente de la dosis) con HVEM, LT β R, DcR3, o proteínas de fusión de los mismos (*por ejemplo*, Fc:HVEM, Fc:LT β R o Fc:DcR3), para su unión a un polipéptido de hLIGHT, tal como un polipéptido de hLIGHT expresado la superficie celular o un polipéptido de hLIGHT soluble, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. En los Ejemplos en el presente documento se proporcionan ensayos de bloqueo competitivo a modo de ejemplo.

65 En el presente documento se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican anticuerpos que se unen de forma inespecífica a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble), un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico codifica una cadena de VH, cadena de VL, dominio de VH, dominio de VL, CDR1 de VH, CDR2 de VH,

CDR3 de VH, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de E1, E13, E63, F19 o F23.

5 En el presente documento se proporcionan vectores y células huésped que comprenden ácidos nucleicos que codifican anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT.

10 En el presente documento se proporcionan métodos para preparar anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. El anticuerpo se puede unir de forma inmuno-específica a una variante de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de un polipéptido de hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L y/o 214K-32L. Además, en el presente documento se proporcionan hibridomas que producen anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, o una variante de SNP del mismo. El hibridoma puede ser el hibridoma que producen E1, E13, E63, F19 o F23.

15 En el presente documento se proporcionan métodos para tratar o aliviar de otro modo uno o más síntomas de una enfermedad mediada por hLIGHT en un sujeto (*por ejemplo*, un sujeto humano), que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble), en los que la actividad de hLIGHT se inhibe mediante el anticuerpo. La enfermedad mediada por hLIGHT puede ser una IBD, tal como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. La enfermedad mediada por hLIGHT puede ser GVHD.

20 En el presente documento se proporcionan métodos para disminuir o inhibir la unión de hLIGHT a HVEM, LT β R y/o DcR3 en un sujeto (*por ejemplo*, un sujeto humano), que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble).

25 En el presente documento se proporcionan métodos para disminuir o inhibir una actividad biológica de hLIGHT, tal como secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, en un sujeto (*por ejemplo*, un sujeto humano), que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular), en los que la actividad biológica de hLIGHT se ve disminuida o inhibida por el anticuerpo.

30 En el presente documento se proporcionan métodos para disminuir o inhibir la unión de hLIGHT a HVEM, LT β R y/o DcR3 en una célula que tiene un hLIGHT expresado la superficie celular, poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble), tal como un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT.

35 En el presente documento se proporcionan métodos para disminuir o inhibir una actividad biológica de hLIGHT, tal como secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, en una célula que tiene un receptor de hLIGHT expresado en la superficie celular (tal como, HVEM, LT β R y/o Dc3R), poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble, o una variante del SNP del mismo), en los que la actividad biológica de hLIGHT se ve disminuida o inhibida por el anticuerpo.

40 En el presente documento se proporciona un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT, en el que dicho anticuerpo comprende adicionalmente una marca detectable. En determinadas realizaciones, anticuerpos anti-hLIGHT que comprenden una marca detectable se usan en un método para la detección de hLIGHT en una muestra, comprendiendo dicho método poner en contacto la muestra con el anticuerpo anti-hLIGHT. En realizaciones específicas, vamos a comprender una célula que expresa hLIGHT en la superficie de la célula.

45 En el presente documento se proporcionan kits que comprenden un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT.

55 Terminología

60 A menos que se decida de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado tal como normalmente lo entiende un experto habitual en la materia. En el caso en el que exista una pluralidad de definiciones para un término en el presente documento, los que aparecen en esta sección prevalecen a menos que se indique de otro modo.

65 El término "aproximado" o "aproximadamente" se refiere a dentro de un 20 %, preferentemente dentro de un 10 %, y más preferentemente dentro de un 5 % (o un 1 % o inferior) de un valor o intervalo dado.

- Tal como se usa en el presente documento, "administrar" o "administración" se refiere al acto de inyectar o de otro modo administrar físicamente una sustancia tal como existe fuera del organismo (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-hLIGHT proporcionado en el presente documento) en un paciente, tal como mediante administración mucosal, intradérmica, intravenosa, intramuscular y/o cualquier otro método de administración física que se describe en el presente documento o conocido en la técnica. Cuando se está tratando una enfermedad, o un síntoma de la misma, la administración de la sustancia se produce por lo general después del inicio de la enfermedad o síntomas de la misma. Cuando se está previniendo una enfermedad, o síntomas de la misma, la administración de la sustancia se produce por lo general antes del inicio de la enfermedad o síntomas de la misma.
- En el contexto de un polipéptido, el término "análogo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que posee una función similar o idéntica tal como un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de un polipéptido de hLIGHT, o un anticuerpo anti-hLIGHT pero no comprende necesariamente una secuencia de aminoácidos similar o idéntica de un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de un polipéptido de hLIGHT, o un anticuerpo anti-hLIGHT, o posee una estructura similar o idéntica de un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de un polipéptido de hLIGHT, o un anticuerpo anti-hLIGHT. Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos similar refiere a un polipéptido que satisface al menos uno de los siguientes: (a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es de al menos idéntica en un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, y preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, o lo más preferentemente al menos un 99 % a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, SEC ID N°: 52), un fragmento de un polipéptido de hLIGHT, o un anticuerpo anti-hLIGHT descrito en el presente documento; (b) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de un polipéptido de hLIGHT, o un anticuerpo anti-hLIGHT (o una región VH o VL del mismo) descrito en el presente documento de al menos un 5 restos de aminoácidos, al menos 10 restos de aminoácidos, al menos 15 restos de aminoácidos, al menos 20 restos de aminoácidos, al menos 25 restos de aminoácidos, al menos 40 restos de aminoácidos, al menos 50 restos de aminoácidos, al menos 60 restos de aminoácidos, al menos 70 restos de aminoácidos, al menos 80 restos de aminoácidos, al menos 90 restos de aminoácidos, al menos 100 restos de aminoácidos, al menos 125 restos de aminoácidos, o al menos 150 restos de aminoácidos (véase, *por ejemplo*, Sambrook y col. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Maniatis y col. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY); y (c) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos que es idéntica en al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, y preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, o lo más preferentemente al menos un 99 % a la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de un polipéptido de hLIGHT, o un anticuerpo anti-hLIGHT (o región VH o VL del mismo) descrito en el presente documento. Un polipéptido con una estructura similar a la de un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de un polipéptido de hLIGHT, o un anticuerpo anti-hLIGHT descrito en el presente documento se refiere a un polipéptido que tiene una estructura secundaria, terciaria o cuaternaria similar de un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de un hLIGHT, o un anticuerpo de hLIGHT descrito en el presente documento. La estructura de un polipéptido se puede determinar por métodos conocidos por los expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear, y microscopía electrónica cristalográfica.
- Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácidos nucleicos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (*por ejemplo*, se pueden introducir huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos para una alineamiento óptima con una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos). Los restos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones correspondientes del aminoácido o en las posiciones de nucleótidos se comparan a continuación. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada con el mismo resto de aminoácido o nucleótido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (*es decir*, % de identidad = número de posiciones superpuestas idénticas/número total de posiciones X 100 %). Las dos secuencias pueden tener la misma longitud.
- La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias (*por ejemplo*, secuencias de aminoácidos o secuencias de ácidos nucleicos) puede conseguirse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferente, no limitante de un algoritmo matemático usado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 2264 2268, modificado como en Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5873 5877. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul y col., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST se pueden realizar con el conjunto de parámetros para el programa de nucleótidos NBLAST, *por ejemplo*, para puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogos a moléculas de ácido nucleico que se describen en el presente documento. Las búsquedas de proteínas con BLAST se pueden realizar con el conjunto de parámetros para el programa XBLAST, *por ejemplo*, para puntuar 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homóloga a una molécula de proteína que se describe en el presente documento. Para obtener alineaciones de

huecos para fines de comparación, se puede usar BLAST con Huecos tal como se describe en Altschul y col., 1997, Nucleic Acids Res. 25:3389 3402. Como alternativa, se puede usar PSI BLAST para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (*id.*). Cuando se usan los programas BLAST, BLAST con Huecos, y PSI Blast, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (*por ejemplo*, de XBLAST y NBLAST) (véase, *por ejemplo*, National Center for Biotechnology Information (NCBI) en la página web, ncbi.nlm.nih.gov). Otro ejemplo preferente, no limitante de un algoritmo matemático usado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, 1988, CABIOS 4: 11 17. Dicho algoritmo se incorporan el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias GCG. Cuando se usa al programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede usar una tabla con el peso de los restos PAM120, una penalización en la longitud del hueco de 12, y una penalización del hueco de 4.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar usando técnicas similares a las que se han descrito anteriormente, permitiendo o sin permitir huecos. En el cálculo del porcentaje de identidad, por lo general solamente se cuentan emparejamientos exactos.

Tal como se usa en el presente documento, un "antagonista" o "inhibidor" de hLIGHT se refiere a una molécula que es capaz de inhibir o disminuir de otro modo una o más de las actividades biológicas de hLIGHT, tal como en una célula que expresa hLIGHT o en una célula que expresa un ligando de hLIGHT, tal como un receptor de hLIGHT. Por ejemplo, anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos antagonistas que inhiben o disminuyen de otro modo la secreción de CCL20, IL-8 y/o RANTES a partir de una célula que tiene un receptor de hLIGHT expresado en la superficie celular (*por ejemplo*, HVEM, LT β R y/o DcR3) cuando dicho anticuerpo se pone en contacto con dicha célula. Un antagonista de hLIGHT (*por ejemplo*, un anticuerpo antagonista de la invención) puede, por ejemplo, actuar mediante la inhibición o la disminución de otro modo de la activación y/o rutas de señalización celular de la célula que expresa un receptor de hLIGHT, inhibiendo por lo tanto una actividad biológica mediada por hLIGHT de la célula con respecto a la actividad biológica mediada por hLIGHT en ausencia de antagonista. En determinadas realizaciones, los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento son anticuerpos antagonistas de anti-hLIGHT, totalmente humanos, preferentemente anticuerpos antagonistas anti-hLIGHT, monoclonales, totalmente humanos.

El término "anticuerpo" e "inmunoglobulina" o "Ig" se pueden usar de manera indistinta en el presente documento. Las expresiones "anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT," "anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT", "anticuerpos anti-hLIGHT" y expresiones análogas también se usan de manera indistinta en el presente documento y hacen referencia a anticuerpos y fragmentos de los mismos, que se unen específicamente a un polipéptido de hLIGHT, tal como un antígeno o epítipo de hLIGHT. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT puede tener una reacción cruzada con antígenos relacionados. Preferentemente, un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT no tiene una reacción cruzada con otros antígenos. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT se puede identificar, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore, u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia. Un anticuerpo o un fragmento el mismo se une específicamente a un antígeno de hLIGHT cuando se une a un antígeno de hLIGHT con mayor afinidad que a cualquier antígeno con reacción cruzada tal como se determina usando técnicas experimentales, tales como radioinmunoensayos (RIA) y ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Por lo general, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal por ruido de fondo y más generalmente más de 10 veces el fondo. Véase, *por ejemplo*, Paul, ed., 1989, Fundamental Immunology, Segunda Edición, Raven Press, Nueva York en las páginas 332-336 para un análisis con respecto a la especificidad del anticuerpo.

Anticuerpos de de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos multiespecíficos (que incluyen anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, intracuerpos, Fvs de una sola cadena (scFv) (*por ejemplo*, que incluyen mono-específicos, biespecíficos, *etc.*), anticuerpos camelizados, fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab'), Fvs unido a disulfuro (sdFv), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), y fragmentos de unión un epítopos de cualquiera de los anteriores. En particular, los anticuerpos de la presente divulgación incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, dominios de unión a antígenos o moléculas que contienen un sitio de unión a antígenos que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT (*por ejemplo*, una o más regiones que determinan la complementariedad (CDR) de un anticuerpo anti-hLIGHT). Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser de cualquier tipo (*por ejemplo*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), cualquier clase (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2), o cualquier subclase (*por ejemplo*, IgG2a e IgG2b) de molécula de inmunoglobulina. Preferentemente, los anticuerpos hLIGHT son totalmente humanos, tales como los anticuerpos hLIGHT monoclonales totalmente humanos. Los anticuerpos que se desvelan en el presente documento pueden ser anticuerpos IgG, o una clase (*por ejemplo*, IgG1 o IgG4 humana) o subclase de los mismos.

La expresión "dominio de unión a antígenos," "región de unión a antígenos," "fragmento de unión a antígenos," y expresiones similares hacen referencia a la porción de un anticuerpo que comprende los restos de aminoácidos que interactúan con un antígeno y confieren al agente de unión su especificidad y afinidad por el antígeno (*por ejemplo*,

las regiones que determinan la complementariedad (CDR)). La región de unión al antígeno puede tener su origen en cualquier especie animal, tal como roedores (*por ejemplo*, conejo, rata o hámster) y seres humanos. Preferentemente, la región de unión al antígeno será de origen humano.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "composición" pretende incluir un producto que contiene los ingredientes especificados (*por ejemplo*, un anticuerpo tal como se describe en el presente documento) in, opcionalmente, las cantidades especificadas, así como cualquier producto que da como resultado, directa o indirectamente, a partir de la combinación de los ingredientes especificados, opcionalmente, las cantidades especificadas.

10 La expresión "región constante" o "dominio constante" se refiere a una porción terminal carboxi de cadena ligera y pesada que no está directamente implicada en la unión del anticuerpo al antígeno pero que presenta diversas funciones efectoras, tales como interacción con el receptor Fc. Los términos hacen referencia a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada con respecto a la otra porción de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión al antígeno. El dominio constante contiene los dominios CH1, CH2 y CH3 de cadena pesada y el dominio CHL de cadena ligera .

En el contexto de un polipéptido, el término "derivado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de un polipéptido de hLIGHT, o un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT que ha sido alterado por la introducción de sustituciones, supresiones o adiciones del resto aminoácido. El término "derivado" tal como se usa en el presente documento también se refiere a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de un polipéptido de hLIGHT, o un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT que se ha modificado químicamente, *por ejemplo*, la unión covalente de cualquier tipo de molécula al polipéptido. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de un polipéptido de hLIGHT, o un anticuerpo de hLIGHT se puede modificar químicamente, *por ejemplo*, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos de protección/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Los derivados se modifican de una manera que es diferente a la de los péptidos o polipéptidos de origen natural o de partida, en el tipo o ubicación de las moléculas unidas. Además, los derivados incluyen la suspensión de uno o más grupos químicos que están presentes naturalmente en el péptido o el polipéptido. Un derivado de un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de un polipéptido de hLIGHT, o un anticuerpo de hLIGHT se puede modificar químicamente mediante modificaciones químicas usando técnicas conocidas por los expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formulación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, un derivado de un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de un polipéptido de hLIGHT, o un anticuerpo de hLIGHT puede contener uno o más aminoácidos no clásicos. Un derivado de polipéptido posee una función similar o idéntica a la de un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de un polipéptido de hLIGHT, o un anticuerpo de hLIGHT que se describen en el presente documento.

La expresión "cantidad eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de una terapia (*por ejemplo*, un anticuerpo o composición farmacéutica proporcionados en el presente documento) que es suficiente para reducir y/o mejorar la gravedad y/o dotación de una enfermedad dada y/o un síntoma relacionado con ésta. Esta expresión también incluye una cantidad necesaria para la reducción o mejora del avance o progresión de una enfermedad dada, reducción o mejora de la recurrencia, desarrollo o inicio de una enfermedad dada, y/o para mejorar o potenciar el efecto o efectos profilácticos o terapéuticos de otra terapia (*por ejemplo*, una terapia distinta a la del anticuerpo anti-hLIGHT que se proporciona en el presente documento). La cantidad eficaz de un anticuerpo que se describe en el presente documento puede ser aproximadamente 0,1 mg/kg (mg de anticuerpo por kg de peso del sujeto) a aproximadamente 100 mg/kg. En determinadas realizaciones, una cantidad eficaz de un anticuerpo proporcionado en las mismas es de aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg aproximadamente 90 mg/kg o aproximadamente 100 mg/kg (o un intervalo de las mismas). "Cantidad eficaz" tal como se usa en el presente documento también puede hacer referencia a la cantidad un anticuerpo tal como se describe en el presente documento para conseguir un resultado especificado (*por ejemplo*, la inhibición de una actividad biológica de hLIGHT de una célula, tal como la inhibición de la secreción de CCL20, IL-8 o RANTES a partir de la célula).

El término "epítipo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una región localizada en la superficie de un antígeno, tal como polipéptido de hLIGHT o fragmento de polipéptido de hLIGHT, que es capaz de unirse a una o más regiones de unión a antígenos de un anticuerpo, y que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente en un ser humano, que es capaz de provocar una respuesta inmune. Un epítipo que tiene actividad inmunogénica es una porción de un polipéptido que provoca una respuesta al anticuerpo en un animal. Un epítipo que tiene actividad antigénica es una porción de un polipéptido al que un anticuerpo de forma inmuno-específica tal como se determina mediante cualquier método bien conocido en la técnica, por ejemplo, mediante los inmunoensayos que se describen en el presente documento. Los epítipos antigénicos no necesitan ser necesariamente inmunogénicos. Los epítipos normalmente consisten en

agrupamientos de moléculas con superficie químicamente activa tales como cadenas laterales de aminoácidos o azúcar y tienen características estructurales tridimensionales específicas así como características de carga específica. Una región de un polipéptido que contribuye a un epítipo puede ser de aminoácidos contiguos del polipéptido o un epítipo puede unirse a partir de dos o más regiones no contiguas del polipéptido. El epítipo puede ser o no un elemento de superficie tridimensional del antígeno. Un epítipo de hLIGHT puede ser un elemento de superficie tridimensional de un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, en una forma trimérica de un polipéptido de hLIGHT). Un epítipo de hLIGHT puede ser un elemento lineal de un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, en una forma trimérica o forma monomérica del polipéptido de hLIGHT). Los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento se pueden unir de forma inmunespecífica a un epítipo de la forma monomérica (desnaturalizada) de hLIGHT, un epítipo de la forma trimérica (nativa) de hLIGHT, o tanto la forma monomérica (desnaturalizada) como la forma trimérica (nativa) de hLIGHT. Los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento se pueden unir de forma inmunespecífica a un epítipo de la forma trimérica de hLIGHT pero no se unen de forma inmunespecífica a la forma monomérica de hLIGHT.

El término "excipientes", tal como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias inertes que se usan normalmente como un diluyente, vehículos, conservantes, aglutinantes, o agente estabilizante para fármacos e incluye, pero no se limita, proteínas (*por ejemplo*, albúmina de suero, *etc*), aminoácidos (*por ejemplo*, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina, glicina, histidina, *etc*), ácidos grasos y fosfolípidos (*por ejemplo*, alquil sulfonatos, caprilato, *etc*), tensioactivos (*por ejemplo*, SDS, polisorbato, tensioactivo no iónico, *etc*), sacáridos (*por ejemplo*, sacarosa, maltosa, trehalosa, *etc*) y polioles (*por ejemplo*, manitol, sorbitol, *etc*). Véase, además, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA.

En el contexto de un péptido o polipéptido, el término "fragmento", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido o polipéptido que comprende menos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa. Dicho fragmento puede surgir, por ejemplo, de un truncamiento en el extremo amino, un truncamiento en el extremo carboxi, y/o una supresión interna de un resto o restos a partir de la secuencia de aminoácidos. Los fragmentos, por ejemplo, pueden provenir de un corte y empalme de ARN alternativo o de la actividad de proteasas *in vivo*. Los fragmentos de hLIGHT que se describen en el presente documento pueden incluir polipéptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos de aminoácidos contiguos, al menos 10 restos de aminoácidos contiguos, al menos 15 restos de aminoácidos contiguos, al menos 20 restos de aminoácidos contiguos, al menos 25 restos de aminoácidos contiguos, al menos 40 restos de aminoácidos contiguos, al menos 50 restos de aminoácidos contiguos, al menos 60 restos de aminoácidos contiguos, al menos 70 restos de aminoácidos contiguos, al menos 80 restos de aminoácidos contiguos, al menos 90 restos de aminoácidos contiguos, al menos 100 restos de aminoácidos contiguos, al menos 125 restos de aminoácidos contiguos, al menos 150 restos de aminoácidos contiguos, al menos 175 restos de aminoácidos contiguos, al menos 200 restos de aminoácidos contiguos, o al menos 250 restos de aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de hLIGHT o un anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un polipéptido de hLIGHT. Un fragmento de un polipéptido de hLIGHT o un anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un antígeno de hLIGHT puede retener al menos 1, al menos 2, o al menos 3 funciones del polipéptido o del anticuerpo.

Las expresiones "anticuerpo totalmente humano" o "anticuerpo humano" se usan de manera indistinta y hacen referencia a un anticuerpo que comprende una región variable humana y, lo más preferentemente una región constante humana. Las expresiones pueden hacer referencia a un anticuerpo que comprende una región variable y una región constante de origen humano. Anticuerpos anti-hLIGHT "totalmente humanos" también pueden incluir anticuerpos que unen polipéptidos de hLIGHT y están codificados consecuencias de ácidos nucleicos que son variantes somáticas de origen natural de secuencias de ácidos nucleicos de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos anti-hLIGHT que se proporcionan en el presente documento pueden ser anticuerpos totalmente humanos. La expresión "anticuerpo totalmente humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana tal como se describe en y Kabat y col. (véase Kabat y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Publicación NIH N° 91-3242). Métodos a modo de ejemplo para producir anticuerpos totalmente humanos se proporcionan, *por ejemplo*, en los Ejemplos en el presente documento, pero se puede usar cualquier método conocido en la técnica.

La expresión "anticuerpo recombinante humano" incluye anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectedo en una célula huésped, anticuerpos aislados a partir de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante, anticuerpos aislados a partir de un animal (*por ejemplo*, un ratón o una vaca) que es transgénico y/o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana (véase *por ejemplo*, Taylor, L. D. y col. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias genéticas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes pueden tener regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (véase Kabat, E. A. y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Publicación NIH N° 91-3242). Sin embargo, dichos anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis

somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de pisa relacionan con secuencias VH y VL de línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*.

5 La expresión "proteína de fusión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo y una secuencia de aminoácidos de un polipéptido o proteína heterólogos (*es decir*, un polipéptido o proteína que normalmente no forman parte del anticuerpo (*por ejemplo*, un anticuerpo antigénico no anti-hLIGHT)). El término "fusión" cuando se usa en relación con hLIGHT o con un anticuerpo anti-hLIGHT se refiere a la unión de un péptido o polipéptido, o fragmento, variante y/o derivados de los mismos, con péptido o polipéptido heterólogo. Preferentemente, la proteína de fusión retiene la actividad biológica del anticuerpo hLIGHT o anti-hLIGHT. La proteína de fusión puede comprender un dominio VH del anticuerpo hLIGHT, dominio VL, CDR de VH (uno, dos o tres CDR de VH), y/o CDR de VL (uno, dos o tres CDR de VL), en el que la proteína de fusión se une de forma inmunoespecífica a un epítipo de hLIGHT.

15 La expresión "cadena pesada" cuando se usa con referencia a un anticuerpo se refiere a cinco tipos distintos, denominados alfa (α), delta (δ), épsilon (ϵ), gamma (γ) y mu (μ), basados en la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada. Estos tipos distintos de cadenas pesadas son bien conocidos y da lugar a cinco clases de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, respectivamente, que incluyen cuatro subclases de IgG, específicamente IgG1, IgG1, IgG3 e IgG4. Preferentemente la cadena pesada es una cadena pesada humana.

20 El término "huésped", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un ser humano.

25 La expresión "célula huésped", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la célula del sujeto en particular transfectada con una molécula de ácido nucleico y a la progenie o progenie potencial de dicha célula. La progenie de dicha célula puede no ser idéntica a la célula precursora transfectada con la molécula de ácido nucleico debido a mutaciones o influencias ambientales que se pueden producir en generaciones sucesivas por la integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula huésped.

30 La expresión "agente inmunomodulador" y variaciones de la misma incluyen, pero no se limitan a, agentes inmunomoduladores, tal como se usa en el presente documento para hacer referencia a un agente que modula un sistema inmune del huésped. Un agente inmunomodulador puede ser un agente inmunosupresor. Un agente inmunomodulador puede ser un agente inmunestimulador. Un agente inmunomodulador usado en las terapias de combinación de la presente divulgación no incluye un anticuerpo anti-hLIGHT o fragmento de unión a antígenos.

35 Agentes inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, anticuerpos, moléculas inorgánicas, agentes miméticos, y moléculas orgánicas.

40 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "en combinación" en el contexto de la administración de otras terapias se refiere al uso de más de una terapia. El uso de la expresión "en combinación" no limita el orden en el que las terapias se administran a un sujeto con una infección. Una primera terapia se puede administrar antes (*por ejemplo*, 1 minuto, 45 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas), simultáneamente, o después (*por ejemplo*, 1 minuto, 45 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas, o 12 semanas) de la administración de una segunda terapia a un sujeto que tuvo, tiene, o es susceptible a una enfermedad mediada por hLIGHT. Se puede administrar cualquier terapia adicional en cualquier orden con las otras terapias adicionales. Los anticuerpos que se describen en el presente documento se pueden administrar en combinación con una o más terapias (*por ejemplo*, terapias que no son los anticuerpos que se describen en el presente documento que se administra actualmente para prevenir, tratar, dirigir, y/o mejorar una enfermedad mediada por hLIGHT. Los ejemplos no limitantes de terapias que se pueden administrar en combinación con un anticuerpo desvelado en el presente documento incluyen agentes analgésicos, agentes anestésicos, antibióticos, o agentes inmunomoduladores o cualquier otro agente enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos y/o en el Physician's Desk Reference.

55 La expresión "sal inorgánica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto que no contiene carbonos que resultan del reemplazo de parte o todos los hidrógenos ácidos o un ácido por un metal o un grupo que actúa como un metal y que a menudo se usa como un compuesto para el ajuste de la tonicidad en composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos. Las sales inorgánicas más comunes son NaCl, KCl, NaH₂PO₄, etc.

60 Un anticuerpo "aislado" o "purificado" está básicamente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular a partir de la que se deriva el anticuerpo, o está básicamente libre de precursores químicos o de otros compuestos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "básicamente libre de material celular" incluye preparaciones de un anticuerpo en las que el anticuerpo se separa de los componentes celulares de las células a partir de los que se aísla o se produce de forma recombinante. Por lo tanto, un anticuerpo que está básicamente libre de material celular incluye preparaciones de anticuerpo que tienen menos de

aproximadamente un 30 %, un 20 %, un 10 %, o un 5 % (en peso seco) de proteína heteróloga (también denominada en el presente documento "proteína contaminante"). Cuando el anticuerpo se produce de forma recombinante, también está preferentemente básicamente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20 %, un 10 %, o un 5 % del volumen de la preparación de proteínas.

5 Cuando el anticuerpo se produce mediante síntesis química, preferentemente está básicamente libre de precursores químicos o de otros agentes químicos, es decir, se separa de precursores químicos o de otros agentes químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, dichas preparaciones del anticuerpo tienen menos de aproximadamente un 30 %, un 20 %, un 10 %, un 5 % (en peso seco) de precursores o compuestos químicos distintos del anticuerpo de interés. Los anticuerpos preferentes de la presente divulgación están aislados o purificados.

15 Una molécula "aislada" de ácido nucleico es una que se separa de otras moléculas de ácido núcleo que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula "aislada" de ácido nucleico, tal como una molécula de ADNc, puede estar básicamente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce con técnicas recombinantes, o básicamente libre de precursores químicos o de otros agentes químicos cuando se sintetiza químicamente. Una molécula o moléculas de ácido nucleicos que codifica un anticuerpo de la presente divulgación pueden estar aisladas o purificadas.

20 Las expresiones "LIGHT humano," "hLIGHT" o "polipéptido de hLIGHT" y expresiones similares se refieren a los polipéptidos (en el presente documento "polipéptidos," "péptidos" y "proteínas" se usan de manera indistinta) que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 52 y polipéptidos relacionados, que incluyen variantes de SNP de los mismos. Polipéptidos relacionados incluyen variantes alélicas (*por ejemplo*, variantes de SNP); variantes de empalme; fragmentos; derivados; variantes de sustitución, supresión, e inserción; polipéptidos de fusión; y homólogos entre especies, preferentemente, que retienen actividad de hLIGHT y/o son suficientes para generar una respuesta inmune de anti-hLIGHT. Variantes de SNP no sinónimas a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de hLIGHT que comprenden 214E-32S (un ácido glutámico en la posición 214 y serina en la posición 32 que un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, el polipéptido de hLIGHT representado en la SEC ID N°: 52)), 214K-32S, 214E-32L y 214E-32L. Además se incluyen formas solubles de hLIGHT que son suficientes para generar una respuesta inmunológica de anti-hLIGHT (véase, *por ejemplo*, SEC ID N°: 53 y SEC ID N°: 54). Como los expertos en la materia observarán, un anticuerpo anti-hLIGHT de la presente divulgación se puede unir a un polipéptido de hLIGHT, fragmento de polipéptido, antígeno, y/o epítipo, como un epítipo es parte del antígeno más largo, que es parte del fragmento de polipéptido más largo, que, a su vez, es parte del polipéptido más largo. hLIGHT puede existir en una forma trimérica (nativa) o monomérica (desnaturalizada).

35 Las expresiones "numeración de Kabat," y expresiones similares se reconocen en la técnica que hacen referencia a un sistema de numeración de restos de aminoácidos que son más variables (*es decir* hipervariables) que otros restos de aminoácidos en las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígenos de los mismos (Kabat y col. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 382-391 y, Kabat y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Publicación NIH N° 91-3242). Para la región variable de la cadena pesada, la región hipervariable varía por lo general de las posiciones del aminoácido 31 a 35 para CDR1, posiciones del aminoácido 50 a 65 para CDR2, y posiciones del aminoácido 95 a 102 para CDR3. Para la región variable de cadena ligera, la región hipervariable varía por lo general de las posiciones del aminoácido 24 a 34 para CDR1, posiciones del aminoácido 50 a 56 para CDR2, y posiciones del aminoácido 89 a 97 para CDR3.

45 La expresión "cadena ligera" cuando se usa con referencia a un anticuerpo se refiere a dos tipos distintos, denominados kappa (κ) o lambda (λ) basados en la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes. Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera son bien conocidas en la técnica. Preferentemente, la cadena ligera es una cadena ligera humana.

50 Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar," "que trata," y "tratamiento" hacen referencia a los efectos beneficiosos que un sujeto obtiene de una terapia (*por ejemplo*, un agente profiláctico o terapéutico), que no da como resultado una cura de la infección. A un sujeto se le pueden administrar una o más terapias (*por ejemplo*, agentes profilácticos o terapéuticos, tales como un anticuerpo tal como se desvela en el presente documento) para "tratar" una enfermedad mediada por hLIGHT (*por ejemplo*, IBD o GVHD), uno o más síntomas de la misma, con el fin de prevenir la progresión o empeoramiento de la enfermedad.

60 La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos homogéneos o básicamente homogéneos, y cada anticuerpo monoclonal por lo general reconocerá un solo epítipo en el antígeno. En realizaciones preferentes, un "anticuerpo monoclonal," tal como se usa en el presente documento, es un anticuerpo producido por un solo hibridoma u otra célula, en donde el anticuerpo se une de forma inmuno-específica solamente a un epítipo de hLIGHT tal como se determina, *por ejemplo*, mediante ELISA un otro ensayo de unión a antígenos o de unión competitiva conocido en la técnica o en los Ejemplos que se proporcionan en el presente documento. El término "monoclonal" no se limita a ningún método en particular para preparar el anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos monoclonales, tal como se desvela en el presente documento, mediante el método de hibridomas tal como se describe en Kohler y col.; Nature, 256:495 (1975) o se

5 puede aislar a partir de bibliotecas de fagos usando las técnicas tal como se describen en el presente documento, por ejemplo. Otros métodos para la preparación de líneas celulares clonales y de anticuerpos monoclonales expresados de este modo son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el Capítulo 11 en: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5ª Ed., Ausubel y col., eds., John Wiley y Sons, Nueva York). Otros métodos a modo de ejemplo para producir otros anticuerpos monoclonales se proporcionan en los Ejemplos en el presente documento.

10 La expresión "de origen natural" o "nativo" cuando se usan en conexión con materiales biológicos tales como moléculas de ácidos nucleicos, polipéptidos, células huésped, y similares, se refiere a los que se encuentran en la naturaleza y no están manipulados por un ser humano.

15 La expresión "farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento se refiere a que está aprobada por una agencia reguladora del gobierno Federal o estatal, o se enumeran en la Farmacopea de Estados Unidos, la Farmacopea Europea u otra Farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, y más particularmente en seres humanos.

20 "Anticuerpos policlonales", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una población de anticuerpos generada como una respuesta inmunogénica a una proteína que tiene muchos epítomos y por lo tanto incluye diversos anticuerpos diferentes dirigidos al mismo o diferentes epítomos dentro de la proteína. Los métodos para producir anticuerpos policlonales son conocidos en la técnica (Véase, *por ejemplo*, el Capítulo 11 en: Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5ª Ed., Ausubel y col., eds., John Wiley y Sons, Nueva York).

Tal como se usa el presente documento, el término "polinucleótido," "nucleótido," "ácido nucleico" "molécula de ácido nucleico" y otros términos similares se usan de manera indistinta e incluyen ADN, ARN, ARNm y similares.

25 Tal como se usa en el presente documento, los términos "prevenir," "que previene," y "prevención" hacen referencia a la inhibición total o parcial del desarrollo, recurrencia, inicio o propagación de una enfermedad mediada por hLIGHT y/o síntomas relacionados con la misma, que resultan de la administración de una terapia o combinación de terapias que se proporcionan en el presente documento (*por ejemplo*, una combinación de agentes profilácticos o terapéuticos, tal como un anticuerpo que se desvela el presente documento).

30 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "agente profiláctico" se refiere a cualquier agente que puede inhibir totalmente o parcialmente el desarrollo, recurrencia, inicio o propagación de una enfermedad mediada por hLIGHT y/o síntoma relacionado con la misma en un sujeto. La expresión "agente profiláctico" puede hacer referencia a un anticuerpo tal como se desvela en el presente documento. La expresión "agente profiláctico" puede hacer referencia a un agente distinto de un anticuerpo tal como se desvela en el presente documento. Preferentemente, un agente profiláctico es un agente que se sabe que es útil o que ha sido usado o que actualmente se está usando para prevenir una enfermedad mediada por hLIGHT y/o un síntoma relacionado con la misma o impedir el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad mediada por hLIGHT y/o un síntoma relacionado con la misma. El agente profiláctico puede ser un anticuerpo anti-hLIGHT totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal anti-hLIGHT totalmente humano.

45 Un "título del suero profilácticamente eficaz" puede ser el título del suero en un sujeto, preferentemente un ser humano, que inhibe totalmente o parcialmente el desarrollo, recurrencia, inicio o propagación de una enfermedad mediada por hLIGHT y/o síntoma relacionado con la misma en dicho sujeto.

50 La expresión "antígeno de hLIGHT" se refiere a esa porción de un polipéptido de hLIGHT a la que se une un anticuerpo de forma inmuno-específica. Un antígeno de hLIGHT también se refiere a un análogo o derivado de un polipéptido de hLIGHT o fragmento del mismo al que se unen un anticuerpo de forma inmuno-específica. Un antígeno de hLIGHT puede ser un antígeno de hLIGHT monomérico o un antígeno de hLIGHT trimérico. Una región de un polipéptido de hLIGHT que contribuye a un epítipo puede ser de aminoácidos contiguos del polipéptido o el epítipo puede unirse a partir de dos o más regiones no contiguas del polipéptido. El epítipo puede tener o no tener un elemento de superficie tridimensional del antígeno. Una región localizada sobre la superficie de un antígeno de hLIGHT que es capaz de provocar una respuesta inmune es un epítipo de hLIGHT. El epítipo puede tener o no tener un elemento de superficie tridimensional del antígeno.

55 Una "enfermedad mediada por hLIGHT" y un "trastorno mediado por hLIGHT" se usan de manera indistinta y hacer referencia a cualquier enfermedad que está causada completamente o parcialmente o es el resultado de hLIGHT. hLIGHT se puede expresar de forma anómala (*por ejemplo*, altamente) en la superficie de una célula. hLIGHT se puede regular de forma positiva de forma anómala en un tipo de célula en particular. La señalización celular normal, anómala o excesiva la puede causar la unión de hLIGHT a un ligando de hLIGHT. En determinadas realizaciones, el ligando de hLIGHT es un receptor de hLIGHT (*por ejemplo*, HVEM, LTβR, o DCR3), por ejemplo, que se expresa en la superficie de una célula, tal como una célula epitelial del colon. La enfermedad mediada por hLIGHT puede ser una enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), tal como enfermedad de Crohn (CD) o colitis ulcerosa (UC). En otras realizaciones, la enfermedad mediada por hLIGHT es la enfermedad de injerto frente a huésped (GVHD).

65 Un "ligando de hLIGHT" se refiere a una molécula que se une o que de otro modo interactúa con hLIGHT.

Preferentemente, el ligando de hLIGHT es un receptor de hLIGHT.

Las expresiones "receptor de hLIGHT" o "receptor de unión a hLIGHT" se usan de manera indistinta en el presente documento y hacen referencia a un polipéptido receptor que se une a hLIGHT. El receptor de hLIGHT puede ser HVEM, FcβR o DcR3. El receptor de hLIGHT se puede expresar en la superficie de una célula, tal como una célula epitelial del colon.

El término "sacárido", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una clase de moléculas que son derivados de alcoholes polihídricos. Los sacáridos se mencionan normalmente como hidratos de carbono y pueden contener diferentes cantidades de unidades de azúcar (sacárido), *por ejemplo*, monosacáridos, disacáridos y polisacáridos.

La expresión "título del suero", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un título de suero promedio en una población de al menos 10, preferentemente al menos 20, y lo más preferentemente al menos 40 sujetos hasta aproximadamente 100, 1000 o más.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "efectos secundarios" incluye efectos no deseados y adversos de una terapia (*por ejemplo*, un agente profiláctico o terapéutico). Los efectos no deseados no son necesariamente adversos. Un efecto adverso a partir de una terapia (*por ejemplo*, un agente profiláctico o terapéutico) podría ser perjudicial o incómodo o arriesgado. Ejemplos de efectos secundarios incluyen, diarrea, tos, gastroenteritis, respiración sibilante, náuseas, vómitos, anorexia, calambres abdominales, fiebre, dolor, pérdida de peso corporal, deshidratación, alopecia, disnea, insomnio, mareos, mucositis, efectos nerviosos y musculares, fatiga, boca seca, y pérdida de apetito, erupciones o hinchazones en el sitio de administración, síntomas parecidos a la gripe tales como fiebre, escalofríos y fatiga, problemas del tracto digestivo y reacciones alérgicas. Los efectos no deseados adicionales experimentados por pacientes son numerosos y conocidos en la técnica. Muchos se describen en el Physician's Desk Reference (60^a ed., 2006).

La expresión "molécula pequeña" y expresiones análogas incluyen, pero no se limitan a, péptidos, miméticos de péptidos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos o inorgánicos (*es decir*, que incluyen compuestos heterorgánicos y/o organometálicos) que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 10.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1.000 gramos por mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 500 gramos por mol, y sales, ésteres, y otras formas farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

Los términos "estabilidad" y "estable" tal como se usan en el presente documento en el contexto de una formulación líquida que comprende un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT hace referencia a la resistencia del anticuerpo en la formulación al desplegamiento térmico y químico, agregación, degradación o fragmentación en cualquier condición dada de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento. Las formulaciones "estables" de la presente divulgación requieren una actividad biológica igual o superior a un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 %, un 99 %, o un 99,5 % en condiciones dadas de fabricación, preparación, transporte y almacenamiento. La estabilidad del anticuerpo se puede evaluar mediante grados de agregación, degradación o fragmentación mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, Electroforesis reductora Capilar en Gel (rCGE), Electroforesis en Gel de Poli(acrilamida con Dodecil Sulfato Sódico) (SDS-PAGE) y HPSEC, en comparación con un anticuerpo de referencia. La estabilidad total de una formulación que comprende un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT se puede evaluar mediante diversos ensayos inmunológicos que incluyen, *por ejemplo*, ELISA y radioinmunoensayo usando el epítipo específico de hLIGHT.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera indistinta. Tal como se usa en el presente documento, un sujeto es preferentemente un mamífero tal como un no primate (*por ejemplo*, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas, *etc.*) o un primate (*por ejemplo*, mono y ser humano), lo más preferentemente un ser humano. El sujeto puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano, que parece a enfermedad mediada por hLIGHT. El sujeto puede ser un mamífero, preferentemente un ser humano, con el riesgo de desarrollar una enfermedad mediada por hLIGHT.

Tal como se usa en el presente documento "básicamente todo" se refiere a al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, o aproximadamente un 100 %.

La expresión "básicamente libre de tensioactivo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una formulación de un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT, conteniendo dicha formulación menos de un 0,0005 %, menos de un 0,0003 %, o menos de un 0,0001 % de tensioactivos y/o menos de un 0,0005 %, menos de un 0,0003 %, o menos de un 0,0001 % de tensioactivos.

La expresión "básicamente libre de sal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una formulación de un anticuerpo que se une de forma inespecífica a un antígeno de hLIGHT, conteniendo dicha formulación menos de un 0,0005 %, menos de un 0,0003 %, o menos de un 0,0001 % de sales inorgánicas.

5 El término "tensioactivo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias orgánicas que tienen estructuras anfipáticas; concretamente, están compuestas por grupos de tendencias opuestas a la solubilidad, por lo general una cadena de hidrocarburos solubles en aceite y un grupo iónico soluble en agua. Los tensioactivo se pueden clasificar, dependiendo de la carga del resto de superficie activa, en tensioactivos aniónicos, catiónicos, y no
10 iónicos. Los tensioactivos se usan a menudo como agentes humectantes, emulgentes, solubilizantes, y dispersantes para diversas composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "marca" se refiere a cualquier tipo de resto que está unido a, *por ejemplo*, un polipéptido y/o un polinucleótido que codifica un hLIGHT o anticuerpo de hLIGHT o fragmento de
15 unión a antígenos del mismo. Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un hLIGHT, hLIGHT anticuerpo o fragmento de unión a antígenos del mismo puede contener una o más secuencias adicionales de nucleótidos que codifican marcas que codifican, *por ejemplo*, un resto detectable con un resto que ayuda en la purificación por afinidad. Cuando se traduce, la marca y el anticuerpo pueden estar en forma de una proteína de fusión. El término "detectable" o "detección" con referencia a una marca se refiere a cualquier marca que es capaz de ser visualizadas
20 o en la que la presencia de la marca es capaz de otro modo de ser determinada y/o medida (*por ejemplo*, por cuantificación). Un ejemplo no limitante de una marca detectable es una marca fluorescente.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que se puede usar en el tratamiento, dirección o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT y/o un síntoma
25 relacionado con la misma. El término "agente terapéutico" puede hacer referencia a un anticuerpo tal como se desvela en el presente documento. El término "agente terapéutico" puede hacer referencia a un agente distinto un anticuerpo tal como se desvela en el presente documento. Preferentemente, un agente terapéutico es un agente que es conocido por ser útil para, o se ha usado o se está usando actualmente para el tratamiento, dirección o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT o uno o más síntomas relacionados con la misma. El agente terapéutico
30 puede ser un anticuerpo anti-hLIGHT totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal anti-hLIGHT totalmente humano.

La combinación de terapias (*por ejemplo*, uso de agentes profilácticos o terapéuticos) que es más eficaz que los efectos aditivos de cualquiera de dos o más terapias individuales. Por ejemplo, un efecto sinérgico de una
35 combinación de agentes profilácticos y/o terapéuticos permite el uso de dosis inferiores de uno o más de los agentes y/o la administración menos frecuente de dichos agentes a un sujeto con una enfermedad mediada por hLIGHT. La capacidad para usar dosis inferiores de terapias profilácticas o terapéuticas y/o para administrar dichas terapias menos frecuentemente reduce la toxicidad asociada con la administración de dichas terapias a un sujeto sin reducir la eficacia de dichas terapias en la prevención, dirección, tratamiento o mejora de una enfermedad
40 mediada por hLIGHT. Además, un efecto sinérgico puede dar como resultado eficacia mejorada de las terapias en la prevención, o en la dirección, tratamiento o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT. Finalmente, un efecto sinérgico de una combinación de terapias (*por ejemplo*, agentes profilácticos o terapéuticos) puede evitar o reducir efectos secundarios adversos o no deseados asociados con el uso de cualquier terapia individual.

45 En la presente divulgación, un "título de suero terapéuticamente eficaz" puede ser el título del suero en un sujeto, preferentemente un ser humano, que reduce la gravedad, la duración y/o los síntomas asociados con una enfermedad mediada por hLIGHT en dicho sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, el término "terapia" se refiere a cualquier protocolo, método y/o agente que se puede usar en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT (*por
50 ejemplo*, IBD o GVHD). Los términos "terapias" y "terapia" pueden hacer referencia a una terapia biológica, terapia de apoyo, y/o otras terapias útiles en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT conocidas por un experto en la materia tal como el personal médico.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar," "tratamiento" y "que trata" hacen referencia la reducción o mejora de la progresión, gravedad, y/o duración de una enfermedad mediada por hLIGHT (*por ejemplo*,
55 IBD o GVHD) que resultan de la administración de una o más terapias (que incluyen, pero no se limitan a, administración de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos, tales como anticuerpo tal como se desvela en el presente documento). Dichos términos hacen referencia a la reducción o inhibición de la unión de hLIGHT a HVEM, la reducción o la inhibición de la unión de hLIGHT a LTβR, la reducción o la inhibición de la unión de hLIGHT a DcR3, la reducción o la inhibición de la producción o secreción de CCL20 a partir de una célula que expresa un receptor de hLIGHT de un sujeto, la reducción o la inhibición de la producción o secreción de IL-8 a partir de una célula que expresa un receptor de hLIGHT de un sujeto, la reducción o la inhibición de la producción o secreción de RANTES a partir de una célula que expresa un receptor de hLIGHT de un sujeto, y/o la inhibición o reducción de uno
60 o más síntomas asociados con una enfermedad mediada por hLIGHT, tal como una IBD o GVHD. Un agente profiláctico puede ser un anticuerpo anti-hLIGHT totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal anti-
65

hLIGHT totalmente humano.

La expresión "región variable" o "dominio variable" se refiere a una porción de las cadenas ligera y pesada, por lo general aproximadamente los 120 a 130 aminoácidos amino-terminales en la cadena pesada y aproximadamente de 100 a 110 aminoácidos en la cadena ligera, que difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo en particular para su antígeno en particular. La variabilidad en la secuencia se concentra en esas regiones denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) mientras que las regiones más altamente conservadas en el dominio variable se denominan regiones marco conservadas (FR). Las CDR de las cadenas ligera y pesada son responsables principalmente de la interacción del anticuerpo con antígenos. La numeración de las posiciones de aminoácidos que se usa en el presente documento está de acuerdo con el Índice EU, tal como en Kabat y col. (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. (Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Washington, D.C.) 5ª ed. ("Kabat y col."). Preferentemente, la región variable es una región variable humana.

El término "variante" cuando se usa con relación a hLIGHT o a un anticuerpo de hLIGHT se refiere a un péptido o polipéptido que comprende una o más (tal como, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, y preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, y lo más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5) sustituciones, supresiones, y/o adiciones de secuencias de aminoácidos en comparación con una secuencia nativa o sin modificar. Por ejemplo, una variante de hLIGHT puede dar como resultado uno o más (tal como, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, y preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, y lo más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5) cambios en una secuencia de aminoácidos de hLIGHT nativo. Además, a modo de ejemplo, una variante de un anticuerpo anti-hLIGHT puede dar como resultado uno o más (tal como, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 25, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, y preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, y lo más preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 5) cambios en una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo anti-hLIGHT nativo o sin modificar previamente. Las variantes pueden ser de origen natural, tal como variantes alélicas o de empalme, o se pueden construir artificialmente. Las variantes de polipéptidos se pueden preparar a partir de las moléculas de ácidos nucleicos correspondientes que codifican dichas variantes. Preferentemente, la variante de hLIGHT una variante del anticuerpo de hLIGHT retiene la actividad funcional de hLIGHT o el anticuerpo de hLIGHT, respectivamente. Una variante de anticuerpo de hLIGHT se puede unir de forma inmuno-específica a hLIGHT y/o es antagonista a la actividad de hLIGHT. La variante se puede codificar mediante una variante de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de hLIGHT. Una variante de SNP a modo de ejemplo de hLIGHT codifica un ácido glutámico (E) o una lisina (K) en la posición 214 del aminoácido. Otra variante de SNP a modo de ejemplo de hLIGHT codifica una serina (S) o una leucina (L) en la posición 32 del aminoácido.

Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1A-1B** representa un análisis por citometría de hLIGHT expresado de forma endógena con anticuerpos anti-hLIGHT humanos. **(A)** La línea II23.D7 de linfocitos T humanos se activó con PMA e inonomicina durante una noche y se tiñó para el marcador de activación CD69 en combinación con diversos anticuerpos anti-hLIGHT. Células positivas CD69 se sometieron a selección y se analizaron para la tinción de hLIGHT (línea en negrita) en comparación con la IgG1 anti-influenza humana de control (línea de puntos) o para la tinción de células II23.D7 sin activar con anticuerpos anti-hLIGHT (línea gris). La unión se detectó con anticuerpo secundario de IgG-APC anti-humano de cabra. **(B)** La tinción de la línea II-23.D7 de linfocitos T humanos activados con anticuerpos anti-hLIGHT humanos es saturable. Células II-23.D7 activadas se marcaron con anticuerpos anti-hLIGHT humanos a diversas concentraciones y se detectaron con IgG-APC anti-humano. Las representaciones de los datos de intensidad de fluorescencia media geométrica se muestran junto con regresión no lineal.

La **Figura 2A-2B** representa la tinción de hLIGHT recombinante en la línea celular de EL4-hLIGHT con anticuerpos anti-hLIGHT humanos. En **(A)** y **(B)**, se usaron cantidades graduadas de anticuerpos anti-hLIGHT para teñir células EL4-hLIGHT, se detectaron con IgG-APC anti-humana y se analizaron mediante citometría de flujo. Se determinó la intensidad de fluorescencia media geométrica (MFI) y se aplicó análisis de regresión no lineal. En todos los experimentos, se usó proteína anti-influenza M2 humana como un control negativo. Los datos obtenidos a partir de este análisis se representan en la Figura 3.

La **Figura 3** representa características de anticuerpos monoclonales de anti-hLIGHT humano.

La **Figura 4** representa el bloqueo cruzado de anticuerpos por ELISA. Este análisis define dos grupos basados en la competencia para la unión a hLIGHT por ELISA. Los anticuerpos individuales se revistieron en los pocillos de una placa de 96 pocillos. El FLAG-hLIGHT soluble se incubó previamente con anticuerpos anti-hLIGHT solubles y a continuación se añadieron a los pocillos revestidos. La unión de FLAG-hLIGHT al anticuerpo revestido se detectó con IgG-HRP anti-FLAG. El porcentaje de inhibición se determinó usando la DO de cada muestra con la siguiente fórmula: % de inhibición = $(\text{máx} - \text{muestra}/\text{máx}) \times 100$.

La **Figura 5A-5B** representa el bloqueo de la unión de HVEM:Fc humano a hLIGHT nativo sobre la superficie celular mediante anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT humano. En **(A)** y **(B)**, se incubaron cantidades graduadas de anticuerpos con células EL4-hLIGHT, se añadió HVEM:Fc humano biotinilado a una concentración de subsaturación y se detectó con SA-APC. Tal como se muestra en **(A)**, el anticuerpo M2 anti-influenza humana se usó como un control.

La **Figura 6A-6B** representa el bloqueo de la unión de LT β R:Fc humano a hLIGHT nativo sobre la superficie celular mediante anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT humanos. En **(A)-(B)**, se incubaron cantidades graduadas de anticuerpos con células EL4-hLIGHT, se añadió LT β R:Fc humano marcado con poliHis a una concentración de subsaturación y se detectó con anti-His-APC. Tal como se muestra en **(A)**, el anticuerpo M2 anti-influenza humana se usó como un control.

La **Figura 7** representa la secreción de CCL20 mediada por hLIGHT a partir de células epiteliales de colon humano. Se añadió hLIGHT soluble recombinante al medio de crecimiento de células HT29.14s a concentraciones crecientes. Los medios de crecimientos se cosecharon en el día 3 después del tratamiento y se determinaron los niveles de CCL20 por ELISA. Las barras de error indican dos tratamientos independientes.

La **Figura 8** representa IL-8 mediado por hLIGHT y secreción de RANTES a partir de células epiteliales de colon humano. hLIGHT, TNF, LT $\alpha_1\beta_2$ y FLAG-BAP solubles recombinantes (como un control negativo) se añadieron al medio de crecimiento de células HT29.14s. Los medios de crecimiento se cosecharon a partir de diferentes pocillos en los días 1, 2 y 3 después del tratamiento. Los niveles de IL-8 y RANTES se determinaron por ELISA. Se usó fosfatasa alcalina bacteriana marcada con FLAG (FLAG-BAP) como un control negativo de proteínas marcado irrelevante.

La **Figura 9A-9B** muestra anticuerpos anti-hLIGHT humanos que inhiben la secreción de CCL20 mediada por hLIGHT a partir de células epiteliales de colon humano. (A) hLIGHT soluble recombinante (1 μ g/ml) se incubó previamente con anticuerpos anti-hLIGHT y se añadió al medio de crecimiento de células HT29.14s. Los medios de crecimiento se cosecharon a partir de los pocillos para cada tratamiento en el día 3. Los niveles de CCL20 se determinaron por ELISA. Medios solos, hLIGHT soluble solo, hLIGHT soluble incubado con anticuerpo M2 anti-influenza y cada anticuerpo anti-hLIGHT sólo se incluyeron como controles. **(B)** El análisis de regresión no lineal de datos se representa en la tabla A.

La **Figura 10A-10B** muestra anticuerpos anti-hLIGHT humanos que inhiben la secreción de RANTES mediada por hLIGHT expresada la superficie celular a partir de células epiteliales de colon humano. (A) Células EL4-hLIGHT fijadas se incubaron previamente con anticuerpos anti-hLIGHT y se añadieron al medio de crecimiento de células HT29.14s. Los medios de crecimiento se cosecharon a partir de los pocillos para cada tratamiento en el día 3. Los niveles de RANTES se determinaron por ELISA. Medios solos, células EL4-hLIGHT solas, hLIGHT soluble solo, y cada anticuerpo anti-hLIGHT sólo se incluyeron como controles. **(B)** Representación de datos representados en **(A)**.

La **Figura 11** representa los resultados de un experimento de bloqueo competitivo para la unión a hLIGHT.

La **Figura 12** representa la actividad de bloqueo de anticuerpos para la unión de HVEM:Fc a células hLIGHT 293. E1, anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT humanos E13 F19, el mAb de R&D, y anticuerpos policlonales anti-hLIGHT de cabra disponibles en el mercado (R&D Systems), y anticuerpos policlonales anti-hLIGHT de conejo (eBioscience) se sometieron a ensayo por su capacidad para bloquear la unión de HVEM:Fc a células 293 que expresaban hLIGHT.

La **Figura 13** representa la actividad de bloqueo de anticuerpos para la unión de LT β R:Fc a células 293. Anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT humanos E1 y E13, el mAb de R&D, y anticuerpos policlonales anti-hLIGHT de cabra disponibles en el mercado (R&D Systems), y anticuerpos policlonales anti-hLIGHT de conejo (eBioscience) se sometieron ensayo por su capacidad para bloquear la unión de LT β R:Fc a células 293 que expresaban hLIGHT.

La **Figura 14** representa la actividad de bloqueo de anticuerpos para la unión de **(A)** LT β R:Fc y **(B)** HVEM:Fc a células hLIGHT 293 y es una representación gráfica de los datos mostrados en las Figuras 12 y 13.

La **Figura 15A-15B** representa la unión de diversos anticuerpos anti-hLIGHT a hLIGHT soluble nativo o desnaturizado. Cinco microgramos de LIGHT humano soluble se hirvieron en tampón de muestra 2 x SDS (desnaturizado) o sin tratar (nativo), y a continuación ambos se diluyeron en serie en incrementos de 6x. 5 μ l de cada dilución de hLIGHT se aplicaron puntualmente de forma simultánea sobre membranas de PVDF de 0,2 μ m hidratadas (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando una pipeta multicanal de 8 puntas. Se permitió que las manchas de transferencia se secaran al aire después de su rehidratación, se bloquearon (1 x TBST (Tween-20 salino tamponado con Tris) + leche desnatada al 2,5 % + azida sódica al 0,02 %). Cada mancha de transferencia se sometió a ensayo con 5 μ g/ml de cada anticuerpo primario. Las manchas de transferencia se lavaron 3x en TBST 1x seguido de Abs secundario biotinilado (α Humano de Biotina-Cabra (Vector Labs, Burlingame, CA), ratón a Biotina-Cabra (Jackson

labs, Bar Harbor, ME), cabra a Biotina-Ratón (Sigma-Aldrich corp., St. Louis, MO)) a 5 µg/ml. Las manchas de transferencia se lavaron 3x en TBST 1x seguido de super SA-HRP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Se usó quimioluminiscencia para detección usando el kit de detección de ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y la señal se visualizó mediante la exposición a película formadora de imágenes X-OMAT AR (Kodak, Rochester, Nueva York). **(A)** Resultados de la transferencia puntual usando mAb anti-hLIGHT humano E1, E13, E63, F19, F23, o dos anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT de murino disponibles en el mercado en R&D Systems ("mAb de ratón de R&D") y Abnova ("mAb de ratón de Abnova"). Se usó un anticuerpo anti-M2 (antígeno irrelevante) como un control negativo. **(B)** Los resultados de la transferencia puntual usando una preparación comercial de anticuerpo policlonal anti-hLIGHT de cabra ("pAb de cabra de R&D" de R&D Systems) o dos preparaciones comerciales de anticuerpo policlonal anti-hLIGHT de conejo (eBioscience ("pAb de conejo de eBioscience") y Peprotech ("pAb de conejo de Peprotech")).

La **Figura. 16** representa la unión de diversos anticuerpos anti-hLIGHT a hLIGHT soluble nativo o desnaturalizado resumen los datos presentados en la Figura 15 en forma tabular.

La **Figura.17** muestra que los anticuerpos anti-LIGHT humanos de la presente divulgación inhiben la secreción de CCL20 mediada por LIGHT a partir de células epiteliales de colon humano, mientras que los anticuerpos anti-hLIGHT de ratón disponibles en el mercado no lo hacen. LIGHT humano soluble (1 µg/ml) se incubó previamente con anticuerpos anti-LIGHT se añadió al medio de crecimiento de células HT29.14s. Los medios de crecimiento se cosecharon a partir de los pocillos para cada tratamiento en el día 3. Los niveles de CCL20 se determinaron por ELISA. Medios solos, LIGHT soluble solo, LIGHT soluble incubado con anticuerpo M2 anti-influenza, Ab B12 anti-LIGHT de no bloqueo y cada anticuerpo anti-LIGHT solo se incluyeron como controles. E1 y F19 son representativos de cada grupo de epítomos de bloqueo cruzado.

La **Figura. 18** muestra que los anticuerpos anti-LIGHT humanos de la presente divulgación inhiben la secreción de RANTES mediada por LIGHT a partir de células epiteliales de colon humano, mientras que los anticuerpos anti-hLIGHT de ratón disponibles en el mercado no lo hacen. LIGHT humano soluble recombinante (1 µg/ml) se incubó previamente con anticuerpos anti-LIGHT y se añadió al medio de crecimiento de células HT29.14s. Los medios de crecimiento se cosecharon a partir de los pocillos para cada tratamiento en el día 3. Los niveles de RANTES se determinaron por ELISA. Medios solos, LIGHT soluble solo, LIGHT soluble incubado con anticuerpo M2 anti-influenza, Ab B12 anti-LIGHT de no bloqueo y cada anticuerpo anti-LIGHT solo se incluyeron como controles. E1 y F19 son representativos de cada grupo de epítomos de bloqueo cruzado.

Las **Figuras 19A-19B** representan un análisis por citometría de la unión de hLIGHT expresada en la superficie celular mediante anticuerpos anti-hLIGHT humanos **(A)** E1 o **(B)** F19 en comparación con sus homólogos de anticuerpos recombinantes de una sola cadena kappa. hLIGHT estables que expresas células 293 se incubaron con cantidades crecientes de anticuerpos anti-LIGHT indicados en la leyenda. La unión se detectó con anticuerpo secundario de IgG-APC anti-humana de cabra. Los anticuerpos se purificaron a partir de cultivos de hibridomas o células 293F transfectadas transitoriamente con vectores de expresión de mamíferos que codifican diferentes ADNc de cadena kappa emparejados con el gen de la cadena pesada. Las representaciones de los datos de intensidad de la fluorescencia media geométrica se muestran junto con la regresión no lineal.

La **Figura 20** representa el bloqueo cruzado de anticuerpos por ELISA en comparación con anticuerpos de una sola cadena kappa con sus homólogos precursores. Este análisis define dos grupos basados en la competencia para la unión a hLIGHT por ELISA. Los anticuerpos individuales se revistieron en los pocillos de una placa de 96 pocillos. FLAG-hLIGHT soluble se incubó previamente con anticuerpos anti-hLIGHT solubles y a continuación se añadieron a los pocillos revestidos. La unión de FLAG-hLIGHT al anticuerpo revestido se detectó con IgG-HRP anti-FLAG. El porcentaje de inhibición se determinó usando la DO de cada muestra con la siguiente fórmula: % de inhibición = (máx - muestra/máx) x 100.

Las **Figuras 21A-21B** representan el bloqueo de **(A)** HVEM:Fc humano o **(B)** LTβR:Fc humano que se une a hLIGHT nativo sobre la superficie celular mediante anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT humanos y sus homólogos recombinantes individuales de cadena kappa. Cantidades graduadas de anticuerpo se incubaron con células EL4-hLIGHT, HVEM:Fc humano biotinilado o LTβR:Fc humano marcado con poliHis añadido a una concentración de subsaturación, y a continuación se detectó con SA-APC o con anti-His-APC. Se purificaron anticuerpos a partir de cultivos de hibridomas o de células 293F transfectadas transitoriamente con vectores de expresión de mamífero que codifican los diferentes ADNc de la cadena kappa emparejados con el gen de la cadena pesada.

La **Figura 22** representa la inhibición de la secreción de CCL20 mediada por hLIGHT a partir de células epiteliales de colon humano mediante anticuerpos anti-LIGHT humanos de cadena kappa individual en comparación con anticuerpos reducidos a partir del hibridoma precursor. LIGHT humano soluble recombinante (1 µg/ml) se incubó previamente con anticuerpos anti-LIGHT y se añadió al medio de crecimiento de células HT29.14s. Los medios de crecimiento se cosecharon a partir de los pocillos para cada tratamiento en el día 3. Los niveles de CCL20 se determinaron por ELISA. Medios solos, LIGHT soluble solo (SHL), LIGHT soluble incubado con anticuerpo M2 anti-

influenza, o cada anticuerpo en ausencia de LIGHT soluble se incluyeron como controles. Los anticuerpos mencionados como "E1k2" comprenden E1kappa(B) y "F19k2" comprende F19kappa(B).

5 La **Figura 23** muestra que los anticuerpos anti-LIGHT humanos de la presente divulgación inhiben la secreción de CCL20 mediada por LIGHT a partir de células epiteliales de colon humano, mientras que los anticuerpos anti-hLIGHT de ratón disponibles en el mercado no la inhiben (Abnova) o solamente la inhiben a concentraciones extremadamente elevadas (100 µg/ml) (R&D). LIGHT humano soluble recombinante (1 µg/ml) se incubó previamente con anticuerpos anti-LIGHT y se añadió al medio de crecimiento de células HT29.14s. Los medios de crecimiento se cosecharon a partir de los pocillos para cada tratamiento en el día 3. Los niveles de CCL20 se determinaron por
10 ELISA. Medios solos, LIGHT soluble solo (SHL), LIGHT soluble incubado con anticuerpo M2 anti-influenza irrelevante, albúmina de suero anti humano, o cada anticuerpo en ausencia de LIGHT soluble se incluyeron como controles. E1 y F19 son representativos de cada grupo de epítomos de bloqueo cruzado.

15 Las **Figuras 24A-24B** representan la frecuencia alélica de determinadas variantes de hLIGHT de polimorfismo nucleótido individual no sinónimo (SNP) **(A)** que codifican un ácido glutámico (E) o lisina (K) en la posición 214 del aminoácido; o **(B)** que codifican una leucina (L) o serina (S) en la posición 32) del aminoácido amino a través de diversas poblaciones étnicas.

20 **Figura 25A-25D.** Las Figuras 25A-25C una valoración de la dosis de la tinción de líneas celulares que expresan variantes de SNP no sinónimas de LIGHT humano con los anticuerpos anti-hLIGHT humanos 124F23 y 124E1kappa(B). Se usaron cantidades graduadas de anticuerpos anti-hLIGHT para teñir células EL4-hLIGHT expresaban la variante SNP **(A)** 214E-32S **(B)** 214K-32S, o **(C)** 214E-32L, se detectaron con IgG-APC anti-humano y se analizaron por citometría de flujo. **(D)** representa una valoración de la dosis de bloqueo mediado por anticuerpo anti-LIGHT humano de HVEM:Fc humano (cuadrados) o LTBR:Fc (triángulos) que se unen a la variante de SNP
25 LIGHT de 214K-32S expresada en la superficie celular realizada tal como en la Figura 5. Para (A)-(D), se determinó la intensidad de la fluorescencia media geométrica (MFI) y se aplicó análisis de regresión no lineal.

30 Las **Figuras 26A-26B** representan un análisis por citometría de flujo de líneas celulares que expresan variantes de SNP no sinónimas con anticuerpos anti-hLIGHT humanos. **(A)** La línea celular 214E de SNP de EL4-LIGHT y **(B)** la línea celular 214K de SNP de EL4 se tiñeron con una concentración (10 µg/ml) de cada anticuerpo anti-hLIGHT. La unión se detectó con anticuerpo secundario de IgG-APC anti-humano de cabra. Se usó el isotipo de IgG humana de control como control negativo.

35 La **Figura 27** representa la inhibición de anticuerpo anti-hLIGHT humano de la secreción de RANTES mediada por la variante SNP de hLIGHT expresaban la superficie celular a partir de células epiteliales de colon humano. hLIGHT soluble recombinante (SHL) (1 µg/ml) o 5×10^5 células de la variante 214K EL4-hLIGHT o 214E SNP se incubaron previamente con anticuerpos anti-hLIGHT y se añadieron al medio de crecimiento de células HT29.14s. Los medios de crecimiento se cosecharon a partir de los pocillos para cada tratamiento en el día 3. Los niveles de RANTES se determinaron por ELISA. Medios solos, células EL4-hLIGHT solas, hLIGHT soluble solo y cada anticuerpo anti-hLIGHT solo se incluyeron como controles.
40

45 La **Figura 28** representa una representación esquemática del modelo GVHD xenogénico agudo. Ratones SCID se inyectan con un anticuerpo IL2Rβ (TM-β1) en el día -2 para disminuir células NK. En el día -1, los patrones reciben 2,5 Gy de radiación subletal. En el día 0, dos ratas reciben 10 millones de PBMC humano por inyección intraperitoneal seguido inmediatamente por inyección intravenosa de un LIGHT anti-humano humano o anticuerpo de control negativo. Los ratones se pesan a intervalos de 3-4 días, y en el día 12, los ratones sacrifican y se evalúan para la patología global. Se retiran los bazo para análisis por citometría de flujo, los ciegos se retiran para histología, y se recoge suero para análisis de citoquinas y anticuerpos.

50 La **Figura 29** representa las puntuaciones globales de patologías observadas en el modelo de la enfermedad GVHD xenogénica aguda de murino. Se representan las puntuaciones de patología para inyección de anticuerpo monoclonal (círculos), inyección de anticuerpo monoclonal anti-hLIGHT 124F23 (triángulos) y anticuerpo monoclonal IgG1 de control humano (cuadrados). Puntuaciones de 0, 1, 2 o 3 (ninguno, leve, moderado, o grave, respectivamente) se asignan para cada una de las tres categorías; diarrea, inflamación peritoneal/ascitis, e inflamación intestinal (puntuación total máxima de 9).
55

60 La **Figura 30** representa las puntuaciones de histopatología observadas en el modelo de la enfermedad de GVHD xenogénica aguda de murino. Se representan puntuaciones de patología para ninguna inyección de MAb (círculos), inyección de MAb anti-hLIGHT 124F23 (triángulos) y MAb de hlgG1 de control (cuadrados). Puntuaciones de 0, 1, 2 o 3 (ninguno, leve, moderado, o grave, respectivamente) se asignan para cada una de las cuatro categorías: gravedad de la inflamación, extensión de la inflamación, daños en las vellosidades/atrofia, y porcentaje de implicación (puntuación total máxima de 12).

65 Las **Figuras 31A-31B** representan secciones histológicas representativas teñidas con hematoxilina y eosina (H y E) del ciego de ratón en el estudio de la GVHD. **(A)** Sección de ciego de ratón tratado con MAb Anti-LIGHT y **(B)** ratón tratado con IgG humana de control. La involución de la sub-mucosa indica ascitis, flechas discontinuas indican

regiones de sangre y la fecha continua indica una región de infiltrado de linfocitos.

La **Figura 32** representa el número total de linfocitos T en el bazo de ratones en el estudio de la GVHD xenogénica. Los asteriscos indican valores del ensayo de t de student inferiores a 0,05 para las comparaciones entre animales y controles tratados con MAb anti-LIGHT.

Descripción detallada

En el presente documento se proporcionan anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. Además se proporcionan ácidos nucleicos aislados que codifican anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. Además se proporcionan vectores y células huésped que comprenden ácidos nucleicos que codifican anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. Además se proporcionan métodos para preparar anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. En el presente documento además se proporciona un método para tratar o que trata una enfermedad mediada por hLIGHT que comprende administrar un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT.

Anticuerpos

Los anticuerpos de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de forma recombinante, anticuerpos multiespecíficos (que incluyen anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, intracuerpos, Fvs de una sola cadena (scFv) (*por ejemplo*, que incluyen mono-específicos, biespecíficos, *etc.*), anticuerpos camelizados, fragmentos de Fab, fragmentos de F(ab'), Fvs unidos por disulfuro (sdFv), anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), y fragmentos de unión un epítipos o cualquiera de los anteriores.

En particular, los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígenos que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT. Las moléculas de inmunoglobulina que se proporcionan en el presente documento pueden ser de cualquier tipo (*por ejemplo*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (*por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclases de moléculas de inmunoglobulina. Un anticuerpo que se proporciona este documento puede ser un anticuerpo IgG, preferentemente un IgG1 o IgG4.

Variantes y derivados de anticuerpos incluyen fragmentos de anticuerpos que retienen la capacidad para unirse específicamente a un epítipo. Fragmentos preferentes incluyen fragmentos de Fab (un fragmento de anticuerpo que contiene el dominio de unión a antígenos y que comprende una cadena ligera y parte de una cadena pesada unida por puente mediante un enlace disulfuro); Fab' (un fragmento de anticuerpo que contienen un solo dominio anti-unión que comprende un Fab y una porción adicional de cadena pesada a través de la región de bisagra); F(ab')₂ (dos moléculas de Fab' unidas mediante enlaces de disulfuro entre cadenas en las regiones de bisagra de las cadenas pesadas; las moléculas de Fab' se pueden dirigir hacia el mismo o diferentes epítipos); un Fab biespecífico (una molécula de Fab que tiene dos dominios de unión a antígenos, cada uno de los cuales se puede dirigir a un epítipo diferente); una cadena de Fab de una sola cadena que comprende una región variable, también conocida como una sFv (la región determinante de unión antígenos, variable de una sola cadena ligera y pesada de un anticuerpo unida en conjunto con una cadena de 10-25 aminoácidos); un Fv unido por disulfuro, o dsFv (la región determinante de unión antígenos, variable de una sola cadena ligera y pesada de un anticuerpo unido en conjunto por un enlace disulfuro); una VH camelizada (la región determinante de unión antígenos, variable de una sola cadena pesada de un anticuerpo en la que algunos aminoácidos en la superficie de contacto de VH son los que se encuentran en la cadena pesada de anticuerpos camélidos de origen natural); un sFv biespecífico (un sFv o una molécula de dsFv que tiene dos dominios de unión a antígenos, cada uno de los cuales se puede dirigir a un epítipo diferente); un fragmento divalente (un sFv dimerizado formado cuando el dominio VH de un primer sFv se une con el dominio VL de un segundo sFv y el dominio VL del primer sFv se une con el dominio VH del segundo sFv; las dos regiones de unión a antígenos del fragmento divalente se pueden dirigir hacia el mismo o diferentes epítipos); y un fragmento trivalente (un sFv trimerizado, formado de una manera similar a la de un fragmento divalente, pero en el que se crean tres dominios de unión a antígenos en un solo complejo; 23 dominios de unión a antígenos se pueden dirigir hacia el mismo o diferentes epítipos). Derivados de anticuerpos también incluyen una o más secuencias de CDR de un sitio de combinación de anticuerpos. Las secuencias de CDR se pueden unir entre sí en una estructura central cuando están presentes dos o más secuencias de CDR. El anticuerpo a usar tal como se describe en el presente documento puede comprender un Fv de una sola cadena ("scFv"). scFv son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptidos. Generalmente, el polipéptido de scFv comprende adicionalmente un enlazador de polipéptido entre los dominios VH y VL que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los scFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds.

Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

5 Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser de cualquier origen animal que incluye pájaros y mamíferos (*por ejemplo*, ser humano, murino, burro, oveja, conejo, cabra, cobaya, camello, caballo, o pollo). Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. Tal como se usa en el presente documento, anticuerpos "humanos" incluyen anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen anticuerpos aislados a partir de bibliotecas de inmunoglobulinas humanas o de ratones que expresan anticuerpos a partir de genes humanos.

10 Preferentemente los anticuerpos de la presente divulgación son anticuerpos totalmente humanos, tales como anticuerpos totalmente humanos que de forma inmuno-específica se unen a un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. Dichos anticuerpos totalmente humanos serían ventajosos sobre anticuerpos humanizados totalmente de ratón (u otros anticuerpos totales o parciales de especies no humanas), anticuerpos humanizados, o quiméricos para minimizar el desarrollo de efectos secundarios no deseados o no necesarios, tales como respuestas inmunes dirigidas hacia anticuerpos no totalmente humanos (*por ejemplo*, anticuerpos anti-hLIGHT derivados de otras especies) cuando se administran al sujeto.

15 Los anticuerpos de la presente divulgación pueden ser mono-específicos, bio-específicos, tri-específicos o de mayor multi-especificidad. Los anticuerpos multi-específicos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido de hLIGHT o pueden ser específicos tanto para un polipéptido de hLIGHT como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Preferentemente, los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento son mono-específicos para un epítipo dado de un polipéptido de hLIGHT y no se unen de forma inmuno-específica a otros epítopos.

25 Anticuerpos preferentes de las composiciones que comprenden los anticuerpos y métodos de uso de los anticuerpos de la presente divulgación incluyen un anticuerpo E1, E13, E63, F19 o F23 (Nº de Acceso PTA-7729, Nº PTA-7842, Nº PTA-7818, Nº PTA-7819, o Nº PTA-7728 de la ATTC, respectivamente). Además, en el presente documento se proporcionan hibridomas que producen los anticuerpos E1, E13, E63, F19 o F23 (Nº de Acceso PTA-7729, Nº PTA-7842, Nº PTA-7818, Nº PTA-7819, o Nº PTA-7728 de la ATTC, respectivamente) y/o otros anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT que se describen en el presente documento.

30 En determinadas realizaciones, en el presente documento se proporciona un anticuerpo aislado que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT en el que la unión al epítipo de hLIGHT mediante el anticuerpo se bloquea de forma competitiva (*por ejemplo*, de una manera dependiente de la dosis) por: (a) un anticuerpo E1, anticuerpo E13, o anticuerpo E63, o (b) un anticuerpo F19 o anticuerpo F23; con la condición de que la unión al epítipo de hLIGHT no se bloquee por ambos de: (a) el anticuerpo E1 y el anticuerpo F19, (b) el anticuerpo E1 y el anticuerpo F23, (c) el anticuerpo E13 y el anticuerpo F19, (d) el anticuerpo E13 y el anticuerpo F23, (e) el anticuerpo E63 y el anticuerpo F19, o (f) el anticuerpo E63 y el anticuerpo F23. El anticuerpo puede ser o no un anticuerpo totalmente humano. Preferentemente el anticuerpo es un anticuerpo anti-hLIGHT monoclonal totalmente humano, e incluso más preferentemente un anticuerpo anti-hLIGHT antagonista, monoclonal, totalmente humano. Ensayos de bloqueo competitivo a modo de ejemplo que se pueden usar se proporcionan en los Ejemplos en el presente documento.

45 Un anticuerpo aislado, preferentemente un anticuerpo totalmente humano, se proporcionan en el presente documento, que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT por el anticuerpo se bloquea competitivamente (*por ejemplo*, de una manera dependiente de la dosis) por: (a) un anticuerpo E1, anticuerpo E13, o anticuerpo E63, o (b) un anticuerpo F19 o anticuerpo F23. El anticuerpo puede ser o no ser un anticuerpo totalmente humano. Preferentemente el anticuerpo es un anticuerpo anti-hLIGHT monoclonal totalmente humano, e incluso más preferentemente un anticuerpo anti-hLIGHT antagonista, monoclonal, totalmente humano. Ensayos de bloqueo competitivo a modo de ejemplo que se pueden usar se proporcionan en los Ejemplos en el presente documento.

50 Los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento pueden competir (*por ejemplo*, de una manera dependiente de la dosis) con HVEM, LT β R y/o DcR3 (o proteína o proteínas de fusión de los mismos) para su unión a hLIGHT expresado en la superficie celular. Los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento pueden competir (*por ejemplo*, de una manera dependiente de la dosis) con HVEM, LT β R y/o DcR3 (o proteína o proteínas de fusión de los mismos) para su unión a hLIGHT soluble. Ensayos de unión competitiva a modo de ejemplo que se pueden usar se proporcionan en los Ejemplos en el presente documento. El anticuerpo puede inhibir parcialmente o completamente la unión de HVEM, LT β R y/o DcR3 a hLIGHT expresado en la superficie celular, tal como hLIGHT. El anticuerpo puede inhibir parcialmente o completamente la unión de HVEM, LT β R y/o DcR3 a hLIGHT soluble. Los anticuerpos. Se proporcionan en el presente documento puede inhibir parcialmente o completamente la secreción de CCL20, IL-8, y/o RANTES a partir de una célula que tiene ligandos hLIGHT expresados en la superficie celular, tal como un receptor de hLIGHT (*por ejemplo*, HVEM, LT β R y/o DcR3). La célula que expresa el receptor de hLIGHT puede ser una célula epitelial de colon.

65 Los anticuerpos de la presente divulgación incluyen los anticuerpos y fragmentos de unión a antígenos de los

siguientes anticuerpos: un E1 anticuerpo (Nº de Acceso PTA-7729 de la ATTC), anticuerpo E13 (Nº de Acceso PTA-7842 de la ATTC), o anticuerpo E63 (Nº de Acceso PTA-7818 de la ATTC), un anticuerpo F19 (Nº de Acceso PTA-7819 de la ATTC) o anticuerpo F23 (Nº de Acceso PTA-7728 de la ATTC) anticuerpo, la Sección de Ejemplos, y en cualquier parte de la solicitud. Un anticuerpo de la presente divulgación puede ser anticuerpo E1, E13, E63, F19, o F23. Un anticuerpo de la presente divulgación comprende un fragmento de unión a antígenos (*por ejemplo*, un fragmento de Fab) de E1, E13, E63, F19, o F23.

Preferentemente, los anticuerpos de la presente divulgación son anticuerpos monoclonales, totalmente humanos, tal como anticuerpos antagonistas monoclonales, totalmente humanos, que se unen de forma inmunoespecífica a hLIGHT.

Los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento se pueden unir a un epítipo de hLIGHT que es un elemento de superficie tridimensional de un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, en una forma trimérica de un polipéptido de hLIGHT). Una región de un polipéptido de hLIGHT que contribuye a un epítipo puede ser aminoácidos contiguos del polipéptido o del epítipo que se unen a partir de dos o más regiones no contiguas del polipéptido. Un epítipo de hLIGHT puede estar presente en (a) la forma trimérica ("un epítipo trimérico de hLIGHT") de hLIGHT, (b) la forma monomérica ("un epítipo monomérico de hLIGHT") de hLIGHT, (c) tanto la forma trimérica como la monomérica de hLIGHT, (d) la forma trimérica, pero no la forma monomérica de hLIGHT, o (e) la forma monomérica, pero no la forma trimérica de hLIGHT.

Por ejemplo, el epítipo puede estar solamente presente o disponible para la unión en la forma trimérica (nativo), pero no está presente ni disponible para la unión en la forma monomérica (desnaturalizado) por un anticuerpo anti-hLIGHT. El epítipo de hLIGHT puede ser elemento lineal del polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, en una forma trimérica o forma monomérica del polipéptido de hLIGHT). Los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento se pueden unir de forma inmunoespecífica a (a) un epítipo de la forma monomérica de hLIGHT, (b) un epítipo de la forma trimérica de hLIGHT, (c) un epítipo de la forma monomérica pero no de la trimérica de hLIGHT, (d) un epítipo de la forma trimérica pero no de la monomérica de hLIGHT, o (e) tanto la forma monomérica, la forma trimérica de hLIGHT. Preferentemente, los anticuerpos se proporcionan en el presente documento se unen de forma inmunoespecífica a un epítipo de la forma trimérica de hLIGHT pero no se unen de forma inmunoespecífica a un epítipo de la forma monomérica de hLIGHT.

La presente divulgación proporciona uno o más anticuerpos que se unen de forma inmunoespecífica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos una cadena de VH y/o una cadena de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una cadena de VH y/o una cadena de VL de un anticuerpo E1, E13, E63, F19, y/o F23; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene Nº de Acceso PTA-7729, Nº PTA-7842, Nº PTA-7818, Nº PTA-7819, o Nº PTA-7728 de la ATTC.

La presente divulgación proporciona uno o más anticuerpos que se unen de forma inmunoespecífica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos un dominio de VH y/o un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de un dominio de VH y/o un dominio de VL de anticuerpo E1, E13, E63, F19, y/o F23; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene Nº de Acceso PTA-7729, Nº PTA-7842, Nº PTA-7818, Nº PTA-7819, o Nº PTA-7728 de la ATTC.

La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen de forma inmunoespecífica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos uno, dos, tres, o más CDR que tienen la secuencia de aminoácidos de uno, dos, tres, o más CDR de anticuerpo E1, E13, E63, F19, y/o F23; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene Nº de Acceso PTA-7729, Nº PTA-7842, Nº PTA-7818, Nº PTA-7819, o Nº PTA-7728 de la ATTC.

La presente divulgación proporciona uno o más anticuerpos que se unen de forma inmunoespecífica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos una combinación de CDR de VH y/o CDR de VL que tienen la secuencia de aminoácidos de CDR de VH y/o CDR de VL de E1, E13, E63, F19, y/o F23; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene Nº de Acceso PTA-7729, Nº PTA-7842, Nº PTA-7818, Nº PTA-7819, o Nº PTA-7728 de la ATTC.

La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen de forma inmunoespecífica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos una cadena de VH y/o una cadena de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cadena de VH y/o una cadena de VL, respectivamente, de un anticuerpo que se une de forma inmunoespecífica a un epítipo de hLIGHT en el que la unión al epítipo de hLIGHT mediante el anticuerpo se bloquea competitivamente de una manera dependiente de la dosis mediante: (a) un anticuerpo E1, E13, o E63, o (b) un anticuerpo F19 o F23; con la condición de que la unión al epítipo de hLIGHT no esté bloqueada por ambos de: (a) el anticuerpo E1 y el F19, (b) el anticuerpo E1 y el F23, (c) el anticuerpo E13 y el F19, (d) el anticuerpo E13 y el F23, (e) el anticuerpo E63 y el F19, o (f) el anticuerpo E63 y el F23.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos totalmente humanos que se unen de forma inmunoespecífica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos una cadena de VH y/o una cadena de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cadena de VH y/o una cadena de VL, respectivamente, de un

anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT mediante el anticuerpo se bloquea competitivamente de una manera dependiente de la dosis mediante: (a) un anticuerpo E1, anticuerpo E13, o anticuerpo E63, o (b) un anticuerpo F19 o anticuerpo F23. Preferentemente, el anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos un dominio de VH y/o un dominio de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de un dominio de VH y/o dominio de VL, respectivamente, de un anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT en el que la unión al epítipo de hLIGHT mediante el anticuerpo se bloquea competitivamente de una manera dependiente de la dosis mediante: (a) un anticuerpo E1, E13, o E63, o (b) un anticuerpo F19 o F23; con la condición de que la unión al epítipo de hLIGHT no esté bloqueada por ambos de: (a) el anticuerpo E1 y el F19, (b) el anticuerpo E1 y el F23, (c) el anticuerpo E13 y el F19, (d) el anticuerpo E13 y el F23, (e) el anticuerpo E63 y el F19, o (f) el anticuerpo E63 y el F23.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos totalmente humanos que se unen de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos un dominio de VH y/o un dominio de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de un dominio de VH y/o un dominio de VL, respectivamente, de un anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT mediante el anticuerpo se bloquea competitivamente de una manera dependiente de la dosis mediante: (a) un anticuerpo E1, anticuerpo E13, o anticuerpo E63, o (b) un anticuerpo F19 o anticuerpo F23. Preferentemente, el anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos uno, dos o tres CDR de VH (*es decir*, CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH) que tienen uno, dos o tres CDR de VH en una secuencia de aminoácidos, respectivamente, de un anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT en el que la unión al epítipo de hLIGHT mediante el anticuerpo se bloquea competitivamente de una manera dependiente de la dosis mediante: (a) un anticuerpo E1, E13, o E63, o (b) un anticuerpo F19 o F23; con la condición de que la unión al epítipo de hLIGHT no esté bloqueada por ambos de: (a) el anticuerpo E1 y el F19, (b) el anticuerpo E1 y el F23, (c) el anticuerpo E13 y el F19, (d) el anticuerpo E13 y el F23, (e) el anticuerpo E63 y el F19, o (f) el anticuerpo E63 y el F23

La presente divulgación también proporciona anticuerpos totalmente humanos que se unen de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo el mismo uno, dos o tres CDR de VH (*es decir*, CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH) que tienen uno, dos o tres CDR de VH en una secuencia de aminoácidos, respectivamente, de un anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT mediante el anticuerpo se bloquea competitivamente de una manera dependiente de la dosis mediante: (a) un anticuerpo E1, anticuerpo E13, o anticuerpo E63, o (b) un anticuerpo F19 o anticuerpo F23. Preferentemente, el anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos uno, dos o tres CDR de VL (*es decir*, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL) que tienen uno, dos o tres CDR de VL en una secuencia de aminoácidos, respectivamente, de un anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT en el que la unión al epítipo de hLIGHT mediante el anticuerpo se bloquea competitivamente de una manera dependiente de la dosis mediante: (a) un anticuerpo E1, E13, o E63, o (b) un anticuerpo F19 o F23; con la condición de que la unión al epítipo de hLIGHT no esté bloqueada por ambos de: (a) el anticuerpo E1 y el F19, (b) el anticuerpo E1 y el F23, (c) el anticuerpo E13 y el F19, (d) el anticuerpo E13 y el F23, (e) el anticuerpo E63 y el F19, o (f) el anticuerpo E63 y el F23.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos totalmente humanos que se unen de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo el mismo uno, dos o tres CDR de VL (*es decir*, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL) que tienen uno, dos o tres CDR de VL en una secuencia de aminoácidos, respectivamente, de un anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, en el que la unión al epítipo de hLIGHT mediante el anticuerpo se bloquea competitivamente de una manera dependiente de la dosis mediante: (a) un anticuerpo E1, anticuerpo E13, o anticuerpo E63, o (b) un anticuerpo F19 o anticuerpo F23. Preferentemente, el anticuerpo totalmente humano es un anticuerpo monoclonal totalmente humano y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos que se unen de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos uno o más CDR de VH (*es decir*, CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH) que tienen uno, dos o tres CDR de VH en una secuencia de aminoácidos (*es decir*, CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH) de E1, E13, E63, F19, y/o F23; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, N° PTA-7842, N° PTA-7818, N° PTA-7819, o N° PTA-7728 de la ATTC; o cualquier combinación de los mismos.

Los anticuerpos que se describen en el presente documento que se unen de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT puede comprender un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio de VH representado en una cualquiera de las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5 y/o un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio de VL representado en una cualquiera de las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, o 10.

Un anticuerpo que se describe en el presente documento que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT puede comprender (a) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 1 y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 82, 6 o 83; (b) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 2 y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 7; (c) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 3 y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 8; (d) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 4 y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 90, 9, 91 o 92; o (e) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 5 y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 10. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Los anticuerpos que se describen en el presente documento que se unen de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT pueden comprender un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente) y/o un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente).

Un anticuerpo que se describe en el presente documento que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT puede comprender (a) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7729 de la ATTC (E1) y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7729 de la ATTC (E1); (b) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7842 de la ATTC (E13) y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7842 de la ATTC (E13); (c) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7818 de la ATTC (E63) y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7818 de la ATTC (E63); (d) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC (F19) y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC (F19); o (e) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7728 de la ATTC (F23) y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7728 de la ATTC (F23). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden comprender una CDR1 de VH que tienen la secuencia de aminoácidos de CDR1 de VH de una cualquiera de las regiones de VH representadas en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden comprender una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos del CDR2 de VH de una cualquiera de las regiones de VH representadas en las SEC ID N°: 1,2,3,4 o 5. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden comprender una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VH de una cualquiera de las regiones de VH representadas en las SEC ID N°:1, 2, 3, 4 o 5. Los anticuerpos de la presente divulgación pueden comprender una CDR1 de VH y/o una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH seleccionados independientemente entre una CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH tal como se representa en una cualquiera de las regiones de VH representadas en las SEC ID N°:1, 2, 3, 4 o 5.

La presente divulgación también proporciona anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos uno o más CDR de VL (*es decir*, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL) que tienen una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los CDR de VL (*es decir*, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL) de E1, E13, E63, F19, y/o F23; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente); o cualquier combinación de los mismos.

Un anticuerpo que se describe en el presente documento que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT comprende (1) un dominio de VH que tiene (a) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°:11, 12 y/o 13, respectivamente, (b) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°:14, 15 y/o 16, respectivamente, (c) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 17, 18, y/o 19, respectivamente, (d) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 20, 21 y/o 22, respectivamente, o (e) una CDR1

de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 23, 24 y/o 24, respectivamente, y/o (2) un dominio de VL que tiene (a) una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 84, 26 o 85; una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 86, 27, o 87; y/o una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 88, 28, o 89, (b) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 29, 30 y/o 31, respectivamente, (c) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 32, 33 y/o 34, respectivamente, (d) una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 93, 35, 94, o 95; una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 96, 36, 97, o 98; y/o una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 96, 36, 97, o 98, o (e) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 38, 39 y/o 40, respectivamente. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Un anticuerpo que se describe en el presente documento que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT puede comprender (1) un dominio de VH que tiene (a) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7729 de la ATTC (E1), (b) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7842 de la ATTC (E13), (c) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7818 de la ATTC (E63), (d) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC (F19), o (e) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7728 de la ATTC (F23), y/o (2) un dominio de VL que tiene (a) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7729 de la ATTC (E1), (b) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7842 de la ATTC (E13), (c) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7818 de la ATTC (E63), (d) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC (F19), o (e) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7728 de la ATTC (F23). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Un anticuerpo que se describe en el presente documento que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT puede comprender (1) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°:11, 12 y/o 13, respectivamente, y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 84, 26 o 85; una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 86, 27, o 87; y/o una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 88, 28, o 89; (2) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 14, 15 y/o 16, respectivamente, y (b) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 29, 30 y/o 31, respectivamente; (3) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 17, 18, y/o 19, respectivamente, y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 32, 33 y/o 34, respectivamente; (4) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 20, 21 y/o 22, respectivamente, y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 93, 35, 94, o 95; una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 96, 36, 97, o 98; y/o una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 96, 36, 97, o 98; o (5) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 23, 24 y/o 24, respectivamente, y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N°: 38, 39 y/o 40, respectivamente. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Un anticuerpo que se describe en el presente documento que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT puede comprender (1) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que

tiene N° de Acceso PTA-7729 de la ATTC (E1), y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7729 de la ATTC (E1); (2) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7842 de la ATTC (E13) y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7842 de la ATTC (E13); (3) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7818 de la ATTC (E63) y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7818 de la ATTC (E63); (4) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC (F19) y una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC (F19); o (5) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7728 de la ATTC (F23) y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7728 de la ATTC (F23). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden comprender una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos del CDR1 de VL de una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente). Los anticuerpos de la presente divulgación pueden comprender una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos del CDR2 de VL de una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente). Los anticuerpos de la presente divulgación pueden comprender una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos del CDR3 de VL de una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente). Los anticuerpos de la presente divulgación pueden comprender una CDR1 de VL y/o una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL seleccionado independientemente entre los CDR1 de VL, CDR2 de VL, CDR3 de VL tal como se representa en una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente).

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden comprender un (1) dominio o cadena de VH que tiene uno o más de (a) una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH de una cualquiera de las regiones de VH representadas en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), (b) una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VH de una cualquiera de las regiones de VH representadas en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), o (c) una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VH de una cualquiera de las regiones de VH representadas en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente); y/o (2) un dominio o cadena de VL que tiene uno o más de (a) una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL de una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), (b) una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VL de una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), y/o (c) una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VL de una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente).

Tabla 1 : Secuencias de regiones de CDR de anticuerpos E1, E 63, F19, y F23 (SEC ID N°).

Ab	VH	CDR1 de VH	CDR2 de VH	CDR3 de VH	VL	CDR1 de VL	CDR2 de VL	CDR3 de VL
E1	(SEC ID N°: 1) RFNMM (SEC ID N°: 11)	YISSSYTYADSVKGG (SEC ID N°: 12)	SIAAFDY (SEC ID N°: 13)	(SEC ID N°: 82, 6*, 83)	RASQGISSALA (SEC ID N°: 84) RASQSVSSSYLT (SEC ID N°: 26*) RASQSVSSSYLA (SEC ID N°: 85)	DASSLES (SEC ID N°: 86) GASSRAT (SEC ID N°: 27*) GASNRAT (SEC ID N°: 87)	QQFNSYRT (SEC ID N°: 88) QQYSSMYT (SEC ID N°: 28*) QQYSSPWT (SEC ID N°: 89)	
E13	(SEC ID N°: 2) NAWMS (SEC ID N°: 14)	RIKSKIDGGTTDYAAPVKG (SEC ID N°: 15)	AMAGAFGF (SEC ID N°: 16)	(SEC ID N°: 7)	RASQSVSSSYLA (SEC ID N°: 29)	GASSRAT (SEC ID N°: 30)	QQYSSPMT (SEC ID N°: 31)	
E63	(SEC ID N°: 3) SGGYWWS (SEC ID N°: 17)	YIYSGSTNYNPSLKS (SEC ID N°: 18)	WITMFRGVGFDP (SEC ID N°: 19)	(SEC ID N°: 8)	RASQSIGSSLH (SEC ID N°: 32)	YASQFS (SEC ID N°: 33)	HQSSSLPLT (SEC ID N°: 34)	
F19	(SEC ID N°: 4) GYNWH (SEC ID N°: 20)	EITHSGSTNYNPSLKS (SEC ID N°: 21)	EIAVAGTGYGMDV (SEC ID N°: 22)	(SEC ID N°: 90, 9*, 91, 92)	RVSQGISSYLN (SEC ID N°: 93) RASRGINSAFA (SEC ID N°: 35*) RMSQGISSYLA (SEC ID N°: 94) RASQGVSSSYLA (SEC ID N°: 95)	SASNQVS (SEC ID N°: 96) DASSLES (SEC ID N°: 36*) AATLQS (SEC ID N°: 97)	QRTJNAPPT (SEC ID N°: 99) QQFNSYPLT (SEC ID N°: 37*) QQYSSFPYT (SEC ID N°: 100) QQRSNWHP (SEC ID N°: 101)	

Ab	VH	CDR1 de VH	CDR2 de VH	CDR3 de VH	VL	CDR1 de VL	CDR2 de VL	CDR3 de VL
F23	(SEC ID N°: 5)	GYWV (SEC ID N°: 23)	EINQYNPVSLKS (SEC ID N°: 24)	EIAIADKGYGGLDV (SEC ID N°: 25)	(SEC ID N°: 10)	RASQGISSALA (SEC ID N°: 38)	DASSLES (SEC ID N°: 39)	QQFNSSYPLT (SEC ID N°: 40)
* Secuencias preferentes de VL de E1 y F19 CDR1-3 de VL.								

La presente divulgación también proporciona anticuerpos que comprenden una o más CDR de VH y una o más CDR de VL enumeradas en la Tabla I. En particular, la presente divulgación proporciona un anticuerpo que comprende una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23) y una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38); CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23); una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH1, una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), a CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), a CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), a CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); o cualquier combinación de los mismos de los CDR de VH (SEC ID N°: 11-25) y CDR de VL (SEC ID N°: 26-40) enumerados en la Tabla I. Los CDR de VH y CDR de VL correspondientes de N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19, o F23), también se pueden usar en cualquiera de las combinaciones que se han enumerado anteriormente. Preferentemente, el anticuerpo es un

anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

5 La presente divulgación también proporciona anticuerpos que se unen de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, anticuerpos que comprenden derivados de los dominios de VH, CDR de VH, dominios de VL, y CDR de VL descritos en el presente documento que se unen de forma inmunespecífica a un antígeno de hLIGHT. La presente divulgación también proporciona anticuerpos que comprenden derivados de E1, E13, E63, F19, y/o F23, en la que dichos anticuerpos se unen de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT. Se pueden usar técnicas convencionales técnicas conocidas por los expertos en la materia para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de la presente divulgación, que incluye, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR que da como resultado sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, los derivados incluyen menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos, o menos de 2 sustituciones de aminoácidos con respecto a la molécula original. Preferentemente, los derivados que tienen sustituciones conservativas de aminoácidos se preparan en uno o más restos de aminoácidos no esenciales predichos. Una "sustitución conservativa de aminoácidos" es una en la que el resto de aminoácido está reemplazado con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral con una carga similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*por ejemplo*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*por ejemplo*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (*por ejemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (*por ejemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (*por ejemplo*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*por ejemplo*, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Como alternativa, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia de codificación, tal como por mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden identificar sistemáticamente para la actividad biológica para identificar mutantes que retienen actividad. Después de la mutagénesis, se puede expresar la proteína codificada y se puede determinar la actividad de la proteína.

30 Un anticuerpo que se describe en el presente documento que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % a la secuencia de aminoácidos de E1, E13, E63, F19, y/o F23, o un fragmento de unión a antígenos de la misma, tal como el dominio de VH, dominios de VL, cadena de VH, o cadena de VL. En una realización, un anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT comprende la secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % a una secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N^o: 1, 2, 3, 4 o 5. Un anticuerpo que se describe en el presente documento que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT puede comprender una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % a una secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N^o: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10. Un anticuerpo tal como se describe en el presente documento que se puede unir de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT comprende una secuencia de aminoácidos CDR de VH y/o una CDR de VL que es idéntica en al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, o al menos un 99 % a una secuencia de aminoácidos CDR de VH amino representada en las SEC ID N^o: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 (CDR de VH) y/o una secuencia de aminoácidos CDR de VL representada en las SEC ID N^o: 84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39, o 40.

55 El anticuerpo que se describe en el presente documento puede ser un anticuerpo anti-humano totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano. Anticuerpos totalmente humanos se pueden producir mediante cualquier método conocido en la técnica. Métodos a modo de ejemplo incluyen inmunización con un antígeno de hLIGHT (cualquier polipéptido de hLIGHT capaz de provocar una respuesta inmune, y opcionalmente y conjugarse con un vehículo) de animales transgénicos (*por ejemplo*, ratones) que son capaces de producir una gama de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena; véase, *por ejemplo*, Jakobovits y col., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 2551; Jakobovits y col., (1993) Nature, 362: 255 258 (1993); Bruggemann y col., (1993) Year in Immunol., 7:33. Otros métodos para producir anticuerpos anti-hLIGHT totalmente humanos se pueden encontrar en los Ejemplos que se proporcionan en el presente documento.

65 Como alternativa, se pueden generar anticuerpos totalmente humanos a través de la identificación sistemática *in vitro* de bibliotecas de anticuerpos de presentación en fagos; véase *por ejemplo*, Hoogenboom y col., J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991). Se han descrito diversas bibliotecas de presentación en

fagos que contienen anticuerpos y un experto en la materia las puede preparar fácilmente. Las bibliotecas pueden contener diversas secuencias de anticuerpos humanos, tales como fragmentos de Fab, Fv, y scFv humano, que se pueden identificar sistemáticamente frente a una diana apropiada.

5 Preferentemente, los anticuerpos usados de acuerdo con los métodos de la presente divulgación tienen una alta afinidad por un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido o epítipo del mismo. Los anticuerpos usados de acuerdo con los métodos de la presente divulgación tienen mayor afinidad por un anticuerpo de hLIGHT que los anticuerpos conocidos (*por ejemplo*, anticuerpos monoclonales disponibles en el mercado que se analizan en cualquier parte en el presente documento). Los anticuerpos usados de acuerdo con los métodos de la presente divulgación pueden tener una mayor afinidad de 2 a 10 veces (o más) por un antígeno de hLIGHT que por un anticuerpo anti-hLIGHT conocido tal como se evalúa mediante técnicas que se describen en el presente documento o conocidas por un experto en la materia (*por ejemplo*, un ensayo de BIAcore). La afinidad de los anticuerpos se puede evaluar mediante un ensayo de BIAcore.

15 Un anticuerpo tal como se describe en el presente documento que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT puede comprender una secuencia de aminoácidos de un dominio de VH y/o una secuencia de aminoácidos de un dominio de VL codificado por una secuencia de nucleótidos que hibrida a (1) el complemento de una secuencia de nucleótidos que codifica uno cualquiera de los dominios de VH y/o VL representados en las SEC ID N°: 41, 42, 43, 44 o 45 (VH) y/o SEC ID N°: 102, 46, 103, 47, 48, 104, 49, 105, 106, o 50 (VL) o (2) el complemento de una secuencia de nucleótidos que codifica uno cualquiera de los dominios de VH o VL de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene el N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23) en condiciones rigurosas (*por ejemplo*, hibridación a ADN unido a filtro en 6x cloruro sódico/citrato sódico (SSC) a aproximadamente 45 °C seguido de uno o más lavados con 0,2 x SSC/SDS al 0,1 % a aproximadamente 50-65 °C) en condiciones altamente rigurosas (*por ejemplo*, hibridación a ácido nucleico unido a filtro en 6 x SSC aproximadamente 45 °C seguido de uno o más lavados en 0,1 x SSC/SDS al 0,2 % a aproximadamente 68 °C), o en otras condiciones rigurosas de hibridación que son conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. y col., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3).

30 Un anticuerpo tal como se describe en el presente documento que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT puede comprender una secuencia de aminoácidos de una CDR de VH o una secuencia de aminoácidos de CDR de VL codificados con una secuencia de nucleótidos que hibrida al complemento de una secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera de las CDR de VH y/o CDR de VL representadas en las SEC ID N°: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 (CDR de VH) y/o SEC ID N°: 84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39, o 40 (CDR de VL) o (b) el complemento de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una cualquiera de las CDR de VH y/o CDR de VL de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23) en condiciones rigurosas (*por ejemplo*, hibridación a ADN unido a filtro en 6 X SSC a aproximadamente 45 °C seguido de uno o más lavados en 0,2 X SSC/SDS al 0,1 % a aproximadamente 50-65 °C), en condiciones altamente rigurosas (*por ejemplo*, hibridación a ácido núcleo unido a filtro en 6 X SSC a aproximadamente 45 °C seguido de uno o más lavados en 0,1 X SSC/SDS al 0,2 % a aproximadamente 68 °C), o en otras condiciones rigurosas de hibridación que son conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel, F.M. y col., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en las páginas 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3).

45 Los anticuerpos de la presente divulgación incluyen anticuerpos que están modificados químicamente, *es decir*, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados del anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado químicamente, *por ejemplo*, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, *etc.* Cualquiera de numerosas modificaciones químicas se pueden realizar mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, escisión química específica, acetilación, formulación, síntesis metabólica de tunicamicina, *etc.* Además, el anticuerpo puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

55 La presente divulgación también proporciona anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT que comprende una región marco conocida por los expertos en la materia (*por ejemplo*, un fragmento humano o no humano). La región marco puede, por ejemplo, ser de origen natural o regiones de marco consenso. Más preferentemente, la región marco de un anticuerpo de la presente divulgación es humana (véase, *por ejemplo*, Chotia y col., 1998, J. Mol. Biol. 278:457-479 para listados de regiones de marco humanas. Véase también Kabat y col. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Washington, D.C.) 5ª ed.

65 La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos la secuencia de aminoácidos de una o más de las CDR de E1, E13, E63, F19, y/o F23 (*es decir*, SEC ID N°: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 (CDR de VH) o SEC ID N°:84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39, o

40 (CDR de VL), o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, N° PTA-7842, N° PTA-7818, N° PTA-7819, o N° PTA-7728 de la ATTC, y regiones de marco humanas con una o más sustituciones de aminoácidos en uno, dos, tres o más de los siguientes restos: (a) restos de marco raros difieren entre el marco de anticuerpo de murino (*es decir*, marco de anticuerpo dador) and el marco de anticuerpo humano (*es decir*, marco de anticuerpo aceptor); (b) restos de la zona Venier cuando difieren entre el marco de anticuerpo dador y el marco de anticuerpo aceptor; (c) restos de empaquetamiento entre cadenas en la superficie de contacto de VH/VL que difieren entre el marco del anticuerpo dador y el marco del anticuerpo aceptor; (d) restos convencionales que difieren entre las secuencias del marco del anticuerpo dador y del marco del anticuerpo aceptor, particularmente las regiones marco cruciales para la definición de la clase convencional de los bucles de CDR de anticuerpo de murino; (e) restos que son adyacentes a una CDR; (g) restos capaces de interactuar con el antígeno; (h) restos capaces de interactuar con la CDR; y (i) restos de contacto entre el dominio de VH y el dominio de VL. Los anticuerpos que se describen en el presente documento que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT pueden comprender las regiones marco humanas con uno o más sustituciones de aminoácidos en uno, dos, tres o más de los restos que se han identificado anteriormente que son anticuerpos hLIGHT antagonistas.

La presente divulgación incluye anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos la secuencia de aminoácidos del dominio de VH y/o del dominio de VL o un fragmento de unión a antígenos de los mismos de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene el N° de Acceso PTA-7729, N° PTA-7842, N° PTA-7818, N° PTA-7819, o N° PTA-7728 de la ATTC), o de un anticuerpo E1, E13, E63, F19, y/o F23, que tiene mutaciones (*por ejemplo*, una o más sustituciones de aminoácidos) en las regiones marco. Los anticuerpos que se describen en el presente documento que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT pueden comprender la secuencia de aminoácidos del dominio de VH y/o del dominio de VL o un fragmento de unión a antígenos de la misma de E1, E13, E63, F19, y/o F23 con uno o más sustituciones de restos de aminoácidos en las regiones marco de los dominios de VH y/o de VL.

La presente divulgación también incluye anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT, comprendiendo dichos anticuerpos la secuencia de aminoácidos del dominio de VH y/o del dominio de VL de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene el N° de Acceso PTA-7729, N° PTA-7842, N° PTA-7818, N° PTA-7819, o N° PTA-7728 de la ATTC, o de un anticuerpo E1, E13, E63, F19, y/o F23, que tiene mutaciones (*por ejemplo*, una o más sustituciones de restos de aminoácidos) en las regiones hipervariable y marco. Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos en las regiones hipervariable y marco mejoran la unión del anticuerpo a un antígeno de hLIGHT.

Los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento pueden disminuir o inhibir la unión de hLIGHT a HVEM, LTβR y/o DcR3, y/o disminuir o inhibir una actividad biológica de hLIGHT, tal como la secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, en sujetos (*por ejemplo*, un sujeto humano). Los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento, tales como un anticuerpo anti-hLIGHT monoclonal humano, puede disminuir o inhibir la unión de un hLIGHT soluble o expresado en la superficie a HVEM o LTβR, y/o disminuir o inhibir la secreción de CCL20 y/o RANTES después del contacto con un hLIGHT soluble o expresado en la superficie celular, en un sujeto. El hLIGHT puede ser una variante de SNP de hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L o 214K-32L. La actividad de bloqueo de un anticuerpo proporcionado en el presente documento de unión de hLIGHT a HVEM, LTβR y/o DCR3 se puede detectar usando un ensayo tal como se describe en uno cualquiera de los Ejemplos 1-4. La inhibición de la actividad biológica de células que expresan un receptor de hLIGHT mediante un anticuerpo de hLIGHT proporcionado en el presente documento se puede detectar usando un ensayo tal como se describe en uno cualquiera de los Ejemplos 1-4.

Los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento pueden disminuir o inhibir la unión de hLIGHT a HVEM, LTβR y/o DcR3 y/o disminuir o inhibir una actividad biológica de hLIGHT, tal como secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, en una célula que tiene un receptor de hLIGHT expresado en la superficie celular (tal como, HVEM, LTβR y/o Dc3R). Los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento, tales como un anticuerpo anti-hLIGHT monoclonal humano, pueden disminuir o inhibir la unión de hLIGHT soluble o expresado en la superficie celular a HVEM o LTβR, y/o disminuir o inhibir la secreción de CCL20 y/o RANTES, en una célula que tiene un receptor de hLIGHT expresado en la superficie celular después del contacto con hLIGHT soluble o expresado en la superficie celular. En algunas realizaciones, el hLIGHT es una variante de SNP de hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L o 214K-32L. La actividad de bloqueo de un anticuerpo que proporcionado en el presente documento de unión de hLIGHT a HVEM, LTβR y/o DCR3 se puede detectar usando un ensayo tal como se describe en uno cualquiera de los Ejemplos 1-4. La inhibición de la actividad biológica de células que expresan un receptor de hLIGHT mediante un anticuerpo de hLIGHT proporcionado en el presente documento se puede detectar usando un ensayo tal como se describe en uno cualquiera de los Ejemplos 1-4.

La presente divulgación también proporciona proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo proporcionado en el presente documento que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT y un polipéptido heterólogo. En algunas realizaciones, el polipéptido heterólogo con el que se condensa el anticuerpo es útil para dirigir el anticuerpo a células que tienen hLIGHT expresado en la superficie celular.

La presente divulgación también proporciona paneles de anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un

antígeno de hLIGHT. La presente divulgación proporciona paneles de anticuerpos que tienen constantes diferentes de velocidad de asociación, constantes diferentes de velocidad de disociación, afinidades diferentes para antígenos de hLIGHT, y/o especificidades diferentes para un antígeno de hLIGHT. La presente divulgación proporciona paneles de aproximadamente 10, preferentemente de aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 125, aproximadamente 150, aproximadamente 175, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente 400, aproximadamente 450, aproximadamente 500, aproximadamente 550, aproximadamente 600, aproximadamente 650, aproximadamente 700, aproximadamente 750, aproximadamente 800, aproximadamente 850, aproximadamente 900, aproximadamente 950, o aproximadamente 1000 anticuerpos o más. Se pueden usar paneles de anticuerpos, por ejemplo, en placas de 96 pocillos o 384 pocillos, tales como para ensayos tal como ELISA.

Conjugados de anticuerpo y proteínas de fusión

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden conjugar o condensar de forma recombinante a un agente terapéutico o cualquier otra molécula detectable, de diagnóstico. Los anticuerpos conjugados o condensados de forma recombinante pueden ser útiles, *por ejemplo*, para controlar o diagnosticar el inicio, desarrollo, progresión y/o gravedad de una enfermedad mediada por hLIGHT como parte de un procedimiento de ensayo clínico, tal como determinar la eficacia de una terapia en particular.

Dicho diagnóstico y detección se puede conseguir, por ejemplo, por acoplamiento del anticuerpo a sustancias detectables que incluyen, pero no se limitan a, diversas enzimas, tales como, pero no limitadas a, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero no limitados a, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero no limitados a, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminescentes, tales como, pero no limitados a, luminol; materiales bioluminescentes, tales como, pero no limitados a, luciferasa, luciferina, y aequorina; materiales radiactivos, tales como, pero no limitados a, yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , y ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , y ^{111}In), tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{32}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , y ^{117}Sn ; y metales de emisión de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones, e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos.

La presente divulgación incluye adicionalmente usos de los anticuerpos que se describen en el presente documento conjugados o condensados de forma recombinante con un resto terapéutico (o uno o más restos terapéuticos). El anticuerpo puede estar conjugado o condensados de forma recombinante con un resto terapéutico, tal como una citotoxina, *por ejemplo*, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión de metal radiactivo, *por ejemplo*, emisores alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Restos terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (*por ejemplo*, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina); agentes alquilantes (*por ejemplo*, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cisdiclorodiamina de platino (II) (DDP), y cisplatino); antraciclinas (*por ejemplo*, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina); antibióticos (*por ejemplo*, d actinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramycin (AMC)); Moléculas de auristatina (*por ejemplo*, auristatina PHE, briostatina 1, y solastatina 10; véase Woyke y col., Antimicrob. Agents Chemother. 46: 3802-8 (2002), Woyke y col., Antimicrob. Agents Chemother. 45: 3580-4 (2001), Mohammad y col., Anticancer Drugs 12: 735- 40 (2001), Wall y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 266: 76- 80 (1999), Mohammad y col., Int. J. Oncol. 15: 367-72 (1999); hormonas (*por ejemplo*, glucocorticoides, progestinas, andrógenos, y estrógenos), inhibidores de enzimas reparadoras de ADN (*por ejemplo*, etopósido o topotecán), inhibidores de quinasas (*por ejemplo*, el compuesto ST1571, mesilato de imatinib (Kantarjian y col., Clin Cancer Res. 8 (7): 2167-76 (2002)); agentes citotóxicos (*por ejemplo*, paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos y los costos que se desvelan en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.245.759, Nº 6.399.633, Nº 6.383.790, Nº 6.335.156, Nº 6.271.242, Nº 6.242.196, Nº 6.218.410, Nº 6.218.372, Nº 6.057.300, Nº 6.034.053, Nº 5.985.877, Nº 5.958.769, Nº 5.925.376, Nº 5.922.844, Nº 5.911.995, Nº 5.872.223, Nº 5.863.904, Nº 5.840.745, Nº 5.728.868, Nº 5.648.239, Nº 5.587.459); inhibidores de la farnesil transferasa (*por ejemplo*, R115777, BMS-214662, y los que se desvelan, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 6.458.935, Nº 6.451.812, Nº 6.440.974, Nº 6.436.960, Nº 6.432.959, Nº 6.420.387, Nº 6.414.145, Nº 6.410.541, Nº 6.410.539, Nº 6.403.581, Nº 6.399.615, Nº 6.387.905, Nº 6.372.747, Nº 6.369.034, Nº 6.362.188, Nº 6.342.765, Nº 6.342.487, Nº 6.300.501, Nº 6.268.363, Nº 6.265.422, Nº 6.248.756, Nº 6.239.140, Nº 6.232.338, Nº 6.228.865, Nº 6.228.856, Nº 6.225.322, Nº 6.218.406, Nº 6.211.193, Nº 6.187.786, Nº 6.169.096, Nº 6.159.984, Nº 6.143.766, Nº 6.133.303, Nº 6.127.366, Nº 6.124.465, Nº 6.124.295, Nº 6.103.723, Nº 6.093.737, Nº 6.090.948, Nº 6.080.870, Nº 6.077.853, Nº 6.071.935, Nº 6.066.738, Nº 6.063.930, Nº 6.054.466, Nº 6.051.582, Nº 6.051.574, y Nº 6.040.305); inhibidores de la topoisomerasa (*por ejemplo*, camptotecina; irinotecán; SN- 38; topotecán; 9-aminocamptotecina; GG- 211 (GI 147211); DX-8951f; IST- 622; rubitecán; pirazoloacridina; XR- 5000; saintopina; UCE6; UCE1022; TAN-1518A; TAN

1518B; KT6006; KT6528; ED-110; NB-506; ED-110; NB-506; y rebecamicina); bulgareína; aglutinantes del surco menor del ADN tales como colorante Hoescht 33342 y colorante Hoechst 33258; nitidina; fagaronina; epiberberina; coralina; beta-lapachona; BC-4-1; bisfosfonatos (*por ejemplo*, alendronato, cimadrona, clodronato, tiludronato, etidronato, ibandronato, neridronato, olpandronato, risedronato, piridronato, pamidronato, zolendronato), inhibidores de la HMG-CoA reductasa, (*por ejemplo*, lovastatina, simvastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, estatina, cerivastatina, lescol, lupitor, rosuvastatina y atorvastatina); oligonucleótidos antisentido (*por ejemplo*, los que se desvelan en las Patentes de Estados Unidos N° 6.277.832, N° 5.998.596, N° 5.885.834, N° 5.734.033, y N° 5.618.709); inhibidores de la adenosina desaminasa (*por ejemplo*, Fosfato de fludarabina y 2-Clordesoxiadenosina); ibritumomab tiuxetán (Zevalin®); tositumomab (Bexxar®) y sales farmacéuticamente aceptables, solvatos, clatratos, y profármacos de los mismos.

Además, un anticuerpo de la presente divulgación puede estar conjugado o condensado de forma recombinante con un resto terapéutico o resto de fármaco que modifica una respuesta biológica dada. Éstos terapéuticos o restos de fármacos no se deben interpretar como limitados a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína, péptido, o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, pseudomonas exotoxina, toxina del cólera, o toxina de difteria; una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, interferón γ , interferón α , factor del crecimiento nervioso, factor del crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno celular, un agente apoptótico, *por ejemplo*, TNF- γ , TNF- γ , AIM I (véase, Publicación Internacional N° WO 97/33899), AIM II (véase, Publicación Internacional N° WO 97/34911), Ligando Fas (Takahashi y col., 1994, J. Immunol., 6: 1567-1574), y VEGF (véase, Publicación Internacional N° WO 99/23105), un agente anti-angiogénico, *por ejemplo*, angiostatina, endostatina o un componente de la vía de coagulación (*por ejemplo*, factor tisular); o, un modificador de la respuesta biológica tal como, por ejemplo, una linfoquina (*por ejemplo*, interferón gamma, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-5 ("IL-5"), interleuquina-6 ("IL-6"), interleuquina-7 ("IL-7"), interleuquina 9 ("IL-9"), interleuquina-10 ("IL-10"), interleuquina-12 ("IL-12"), interleuquina-15 ("IL-15"), interleuquina-23 ("IL-23"), factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos ("GM-CSF"), y factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF"), o un factor de crecimiento (*por ejemplo*, hormona de crecimiento ("GH")), o un agente de coagulación (*por ejemplo*, calcio, vitamina K, factores tisulares, tales como, pero no limitados a, factor de Hageman (factor XII), quininógeno de alto peso molecular (HMWK), precalicreína (PK), factor II de coagulación de proteínas (protrombina), factores V, XIIa, VIII, XIIIa, XI, XIa, IX, IXa, X, fosfolípidos, y monómero de fibrina).

La presente divulgación incluye anticuerpos que se describen en el presente documento conjugados de forma recombinante o conjugados químicamente (conjugaciones covalentes o no covalentes) a una proteína o polipéptido heterólogos (o fragmento de los mismos, preferentemente a un polipéptido de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, aproximadamente 80, aproximadamente 90 o aproximadamente 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En particular, la presente divulgación proporciona proteínas de fusión que comprenden un fragmento de unión a antígenos de un anticuerpo que se describen en el presente documento (*por ejemplo*, un fragmento de Fab, fragmento de Fd, fragmento de Fv, fragmento de F(ab)₂, un dominio de VH, una CDR de VH, un dominio de VL o una CDR de VL) y una proteína, polipéptido, o péptido heterólogos. La proteína, polipéptido, o péptido heterólogos a los que el anticuerpo se puede condensar es útil para dirigir el anticuerpo a un tipo de célula en particular, tal como una célula que expresa hLIGHT o un receptor de hLIGHT. Por ejemplo, un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un receptor de la superficie celular expresado mediante un tipo de célula en particular (*por ejemplo*, una célula inmune) puede estar condensado o conjugado con un anticuerpo modificado de la presente divulgación.

Una proteína conjugada o de fusión de la presente divulgación comprende cualquier anticuerpo que se describe en el presente documento y un polipéptido heterólogo. Una proteína conjugada o de fusión de la presente divulgación puede comprender anticuerpo E1, E13, E63, F19, o F23, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19, o F23), y un polipéptido heterólogo. Una proteína conjugada o de fusión de la presente divulgación puede comprender un fragmento de unión a antígenos de E1, E13, E63, F19, o F23, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19, o F23), y un polipéptido heterólogo. Una proteína conjugada o de fusión de la presente divulgación puede comprender un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios de VH representados en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene el N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19, o F23), y/o un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios de VL sentados en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19, o F23), y un polipéptido heterólogo. Una proteína conjugada o de fusión de la presente divulgación puede comprender una o más CDR de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR de VH representadas en las SEC ID N°: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19, o F23), y un polipéptido heterólogo. Una proteína conjugada o de fusión que se describen en el presente documento puede comprender una o más CDR de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR de VL presentadas en las SEC ID N°: 84,

26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39, o 40, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene^{Nº} de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19, o F23), y un polipéptido heterólogo. Una proteína conjugada o de fusión de la presente divulgación puede comprender al menos un dominio de VH y al menos un dominio de VL representado en las SEC ID Nº: 1, 2, 3, 4 o 5 y SEC ID Nº: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10, respectivamente, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene^{Nº} de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19, o F23), y un polipéptido heterólogo. Una proteína conjugada o de fusión de la presente divulgación puede comprender al menos una CDR de VH y al menos una CDR de VL representadas en las SEC ID Nº: 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 y SEC ID Nº: 84, 26, 85, 86, 27, 87, 88, 28, 89, 2, 30, 31, 32, 33, 34, 93, 35, 94, 95, 96, 36, 97, 98, 99, 37, 100, 101, 38, 39, o 40, respectivamente, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene^{Nº} de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19, o F23), y un polipéptido heterólogo.

Además, un anticuerpo de la presente divulgación se puede conjugar con restos terapéuticos tales como un billón de metal radiactivo, tal como emisores alfa tal como ²¹³Bi o agentes quelantes macrocíclicos útiles para la conjugación de iones radiometálicos, que incluyen, pero no se limitan a, ¹³¹In, ¹³¹Lu, ¹³¹Y, ¹³¹Ho, ¹³¹Sm, a polipéptidos. El agente quelante macrocíclico puede ser ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) que se puede unir al anticuerpo mediante una molécula de enlazador. Dichas moléculas enlazadoras se conocen normalmente en la técnica y se describen en Denardo y col., 1998, Clin Cancer Res. 4 (10): 2483-90; Peterson y col., 1999, Bioconjug. Chem. 10 (4) : 553-7; y Zimmerman y col., 1999, Nucl. Med. Biol. 26 (8): 943-50.

Además, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden condensar con secuencias de marcadores, tal como un péptido para facilitar la purificación. Preferentemente la secuencia de aminoácidos marcadores es un péptido de hexa-histidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc.), entre otras, muchas de las cuales están disponibles en el mercado. Tal como se describe en Gentz y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824, por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras marcas de péptidos útiles para purificación incluyen, pero no se limitan a, la marca de hemaglutinina ("HA"), que corresponde con un epítipo derivados de la proteína de hemaglutinina de la gripe (Wilson y col., 1984, Cell 37: 767), y la marca "FLAG".

Métodos de uso o conjugación de restos terapéuticos (que incluyen polipéptidos) a anticuerpos son bien conocidos, véase, por *ejemplo*, Arnon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld y col. (eds.), páginas 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª Ed.), Robinson y col. (eds.), páginas 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera y col. (eds.), páginas 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin y col. (eds.), páginas 303-16 (Academic Press 1985), Thorpe y col., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58; Pat. de Estados Unidos Nº 5.336.603, Nº 5.622.929, Nº 5.359.046, Nº 5.349.053, Nº 5.447.851, Nº 5.723.125, Nº 5.783.181, Nº 5.908.626, Nº 5.844.095, y Nº 5.112.946; documento EP 307.434; documento EP 367.166; documento EP 394.827; las publicaciones de PCT WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631, y WO 99/04813; Ashkenazi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 10535-10539, 1991; Trauneker y col., Nature, 331: 84-86, 1988; Zheng y col., J. Immunol., 154: 5590-5600, 1995; Vil y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 11337-11341, 1992.

Las proteínas de fusión se pueden generar, por ejemplo, a través de las técnicas de combinación de genes, combinación de motivos, combinación de exones, y/o combinación de codones (denominados colectivamente "combinación de ADN"). La combinación de ADN se puede usar para alterar las actividades de los anticuerpos que se describen en el presente documento (*por ejemplo*, anticuerpos con mayores afinidades y menores velocidades de disociación). Véase, generalmente, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.605.793, Nº 5.811.238, Nº 5.830.721, Nº 5.834.252, y Nº 5.837.458; Patten y col., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8: 724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16 (2) : 76-82; Hansson y col., 1999, J. Mol. Biol. 287: 265-76; y Lorenzo y Blasco, 1998, Biotechniques 24 (2) : 308-313. Los anticuerpos, o los anticuerpos codificados, se pueden alterar a ser sometidos a mutagénesis aleatoria por PCR propensa a error, inserción aleatoria de nucleótidos u otros métodos antes de la recombinación. Un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente divulgación se puede combinar con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, *etc.* de una o más moléculas heterólogas.

Un anticuerpo de la presente divulgación también se puede conjugar con un segundo anticuerpo para formar un anticuerpo heteroconjugado tal como se describe en la Patente de Estados Unidos Nº 4.676.980.

El resto terapéutico o fármaco conjugado o condensado de forma recombinante con un anticuerpo de la presente divulgación que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT se debería elegir para conseguir el efecto o efectos profiláctico o terapéutico deseados. El anticuerpo puede ser un anticuerpo modificado. Un médico o cualquier otro personal médico debería considerar lo siguiente al decidir qué resto terapéutico o fármaco se conjuga o se condensa de forma recombinante con un anticuerpo de la invención: la naturaleza de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad, y la afección del sujeto.

Los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden unir a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Dicho soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

5

Composiciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas que contienen uno o más anticuerpos proporcionados en el presente documento se pueden preparar para su almacenamiento mediante mezcla del anticuerpo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, medios de soporte o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Vehículos, medios de soporte, o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones usadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como octadecildimetilbencilo cloruro de amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol de butilo o bencilo; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (*por ejemplo*, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento, por ejemplo, también se pueden formular en liposomas. Los liposomas que contienen la molécula de interés se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein y col. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang y col. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; y Patentes de Estados Unidos N° 4.485.045 y N° 4.544.545. Liposomas con tiempo de circulación potenciado se desvelan en la Patente de Estados Unidos N° 5.013.556.

Inmunoliposomas particularmente útiles se pueden generar mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición de lípidos que contiene fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Fragmentos de Fab' de un anticuerpo que se proporcionan en el presente documento se pueden conjugar con los liposomas tal como se describe en Martin y col. (1982) J. Biol. Chem. 257: 286-288 mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Un quimioagente terapéutico (tal como Doxorubicina) está contenido opcionalmente dentro del liposoma; Véase Gabizon y col., (1989) J. National Cancer Inst. 81(19): 1484.

Las formulaciones, tales como las que se describen en el presente documento, también pueden contener más de un principio activo cuando sea necesario para la indicación en particular que se está tratando. Las formulaciones pueden comprender un anticuerpo de la presente divulgación y uno o más principios activos con actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente divulgación se puede combinar con uno o más otros agentes terapéuticos. Dicha terapia combinada se puede administrar al paciente en serie o simultáneamente o en secuencia.

Un anticuerpo de la presente divulgación también puede estar atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsula de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA.

Las formulaciones a usar para administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través, *por ejemplo*, de membranas de filtración estériles.

También se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el antagonista, cuyas matrices están en forma de artículos con forma, *por ejemplo*, películas, o microcápsulas. Ejemplos matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietilmetacrilato), o poli (alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de etilo, acetato de etileno y vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxitubúrico. Mientras que polímeros tales como acetato de etileno y vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos

encapsulados permanecen en el organismo durante un período de tiempo largo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden elaborar estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es formación de enlace S-S intermolecular a través de intercambios de tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir modificando restos de sulfhidrilo, liofilizado a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

Las composiciones farmacéuticas que se proporcionan en el presente documento contienen cantidades terapéuticamente eficaces de uno o más de los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento, y opcionalmente uno o más agentes terapéuticos profilácticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas son útiles en la prevención, tratamiento, dirección, o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT, tal como una enfermedad inflamatoria intestinal, o uno o más de los síntomas de la misma.

Los vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos que se proporcionan en el presente documento incluyen cualquiera de dichos vehículos conocidos por los expertos en la materia como adecuados para el modo de administración en particular.

Además, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden formular como el único principio farmacéuticamente activo en la composición o se pueden combinar con otros principios activos (tal como uno u otros agentes profilácticos o terapéuticos más).

Las composiciones pueden contener uno o más anticuerpos de la presente divulgación. En una realización, los anticuerpos se formulan en preparaciones farmacéuticas adecuadas, tales como soluciones, suspensiones, comprimidos, comprimidos dispersables, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida o elixires, para administración oral o en soluciones o suspensiones estériles para administración parenteral, así como preparaciones de parches transdérmicos inhaladores de polvo seco. Los anticuerpos que se han descrito anteriormente se pueden formular en composiciones farmacéuticas usando técnicas y procedimientos bien conocidos en la técnica (véase, *por ejemplo*, Ansel (1985) Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4ª Ed., página 126).

En las composiciones, concentraciones eficaces de uno o más anticuerpos o derivados de los mismos se mezclan o mezclan con un vehículo farmacéutico adecuado. Las concentraciones de los compuestos en las composiciones son eficaces para administrar una cantidad, después de la administración, tratar, prevenir, o mejorar una enfermedad mediada por hLIGHT o síntoma de la misma.

Las composiciones se pueden formular para administración de la dosificación individual. Para formular una composición, la fracción de peso del compuesto se disuelve, suspende, dispersa o de otro modo se mezcla en un vehículo seleccionado a una concentración eficaz de tal modo que la afección tratada se alivia, previene, o uno o más síntomas mejoran.

Un anticuerpo de la presente divulgación está incluido en el vehículo farmacéuticamente aceptable en una cantidad eficaz suficiente para ejercer un efecto terapéuticamente útil en ausencia de efectos secundarios no deseados sobre el paciente tratado. La concentración terapéuticamente eficaz se puede determinar empíricamente sometiendo a ensayo los compuestos en sistemas *in vitro* e *in vivo* usando métodos de rutina y a continuación extrapolados a partir de los mismos para dosificaciones para seres humanos.

La concentración de anticuerpo en la composición farmacéutica dependerá de, *por ejemplo*, las características fisicoquímicas del anticuerpo, el programa de dosificación, y la cantidad administrada así como otros factores conocidos por los expertos en la materia.

Una dosificación terapéuticamente eficaz puede producir una concentración en suero de anticuerpo de aproximadamente 0,1 ng/ml a aproximadamente 50-100 µg/ml. Las composiciones farmacéuticas, en otra realización, proporcionan una dosificación de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 2000 mg de anticuerpo por kilogramo de peso corporal per día. Se pueden preparar formas farmacéuticas de dosificación individual para proporcionar de aproximadamente 0,01 mg, 0,1 mg o 1 mg a aproximadamente 500 mg, 1000 mg o 2000 mg, y en una realización de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 500 mg del anticuerpo y/o una combinación de otros ingredientes esenciales opcionales por forma de dosificación individual.

El anticuerpo se puede administrar de una sola vez, o se puede dividir en un número de dosis más pequeñas para su administración a intervalos de tiempo. Se entiende la dosificación precisa y la duración del tratamiento es una función de la enfermedad que se está tratando y se puede determinar empíricamente usando protocolos de ensayo conocidos o por extrapolación a partir de datos de ensayos *in vivo* o *in vitro*. Se debe indicar que las concentraciones y los valores de dosificación también pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Se debe entender adicionalmente que para cualquier sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos se pueden ajustar

en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración que se está establecen en el presente documento solamente son a modo de ejemplo y no se pretende que limiten el alcance la práctica de las composiciones que se reivindican.

5 Después del la mezcla o adición del anticuerpo, la mezcla resultante puede ser la solución, suspensión, emulsión o similar. La forma de la mezcla resultante depende de un número de factores, que incluyen el modo previsto de administración y la solubilidad del compuesto en el medio de soporte o vehículo seleccionado. La concentración eficaz es suficiente para mejorar los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección tratada y se puede determinar empíricamente.

15 Las composiciones farmacéuticas se proporcionan para la administración a seres humanos y animales en formas de dosificación individual, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, gránulos, soluciones o suspensiones parenterales estériles, y soluciones o suspensiones orales, y emulsiones de aceite en agua que contienen cantidades adecuadas de los compuestos o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos. El anticuerpo que se describe en el presente documento se puede formular y administrar en formas de dosificación individual o formas de dosificación múltiple. Las formas de dosificación individual, tal como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas para seres humanos y animales y se envasan individualmente tal como se conoce en la técnica. Cada dosis individual contiene una cantidad predeterminada del anticuerpo suficiente para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el medio de soporte, vehículo o diluyente farmacéutico requerido. Ejemplos de formas de dosificación individual incluyen ampollas y jeringas y comprimidos o cápsulas embasados individualmente. Las formas de dosificación individual se pueden administrar en fracciones o múltiplos de las mismas. Una forma de dosificación múltiple es una pluralidad de formas de dosificación individual idénticas envasadas en un envase individual para su administración en formas de dosificación individual segregadas.

20 Ejemplos de formas de dosificación múltiple incluyen viales, botellas de comprimidos o cápsulas o botellas de pintas o galones. Por lo tanto, una forma de dosificación múltiple es un múltiplo de dosis individuales que no se segregan en el envasado.

30 Preferentemente, uno o más anticuerpos anti-hLIGHT de la presente divulgación están en una formulación farmacéutica líquida. Las composiciones líquidas farmacéuticamente administrables se pueden preparar, por ejemplo, por disolución, dispersión, o mezclando de otro modo un principio activo tal como se ha definido anteriormente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un vehículo, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, glicoles, etanol, y similares, para formar de este modo una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica a administrar también puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes, agentes emulgentes, agente solubilizantes, agentes para tamponamiento del pH y similares, por ejemplo, acetato, citrato sódico, derivados de ciclodextrina, monolaurato de sorbitán, trietanolamina acetato sódico, oleato de trietanolamina, y otros de dichos agentes.

40 Los métodos reales para preparar dichas formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta materia; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA.

45 Se pueden preparar formas de dosificación o composiciones que contienen el anticuerpo en el intervalo de un 0,005 % a un 100 % con el equilibrio preparado a partir de vehículo no tóxico. Los métodos para la preparación de estas composiciones son conocidos por los expertos en la materia.

50 Las formas de dosificación farmacéutica orales son sólidas, en gel o líquidas. Las formas de dosificación sólidas son comprimidos, cápsulas, gránulos, y polvos a granel. Tipos de comprimidos orales incluyen pastillas para chupar y comprimidos masticables, comprimidos, que pueden estar revestidos entéricamente, revestidos con azúcar o revestidos con película. Las cápsulas pueden ser cápsulas de gelatina dura o blanda, mientras que los gránulos y los polvos se pueden proporcionar en forma no efervescente o efervescente con la combinación de otros ingredientes conocidos por los expertos en la materia.

55 Las formulaciones pueden ser formas de dosificación sólida. Las formulaciones pueden ser cápsulas o comprimidos. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener uno o más de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: una aglutinante; un lubricante; un diluyente; un agente deslizante; un agente desintegrante; un agente colorante; un agente edulcorante; un agente saborizante; un agente humectante; un revestimiento emético; y en revestimiento de película. Ejemplos de aglutinantes incluyen celulosa microcristalina, goma de tragacanto, solución de glucosa, mucílago de goma arábica, solución de gelatina, melaza, polivinilpirrolidina, povidona, crospovidonas, sacarosa y pasta de almidón. Lubricantes incluyen talco, almidón, estearato de magnesio o calcio, lycopodio y ácido esteárico. Diluyentes incluyen, por ejemplo, lactosa, sacarosa, almidón, caolín, sal, manitol y fosfato dicálcico. Agentes deslizantes incluyen, pero no se limitan a, dióxido de silicio coloidal. Agentes disgregantes incluyen croscarmelosa sódica, almidón glicolato sódico, ácido algínico, almidón de maíz, almidón de patata, bentonita, metilcelulosa, agar y carboximetilcelulosa. Agentes colorantes incluyen, por ejemplo, cualquiera de los colorantes de FD y C solubles en agua aprobados y certificados, mezclas de los mismos;

60 y colorantes de FD y C insolubles en agua suspendidos en hidrato de alúmina. Agentes edulcorantes incluyen sacarosa, lactosa, manitol y agentes edulcorantes artificiales tales como sacarina, y cualquier número de sabores

secados por pulverización. Agentes saborizantes incluyen sabores naturales extraídos de plantas tales como frutas y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación agradable, tal como, pero no limitados a menta y salicilato de metilo. Agentes humectantes incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y polioxietileno lauril éter. Revestimientos eméticos incluyen ácidos grasos, grasas, ceras, goma laca, goma laca amoniaca y acetato ftalato de celulosa. Revestimientos de películas incluyen hidroxietil-celulosa, carboximetilcelulosa sódica, polietilenglicol 4000 y acetato ftalato de celulosa.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden proporcionar en una composición que la protege del entorno ácido del estómago. Por ejemplo, la composición se debe formular en un revestimiento entérico que mantiene su integridad en el estómago y libera el activo en el intestino. La composición también se puede formular en combinación con un antiácido u otro ingrediente similar.

Cuando la forma de dosificación individual es una cápsula, puede contener, además de material del tipo que se ha mencionado anteriormente, un vehículo líquido tal como un ácido graso I. Además, las formas de dosificación individual pueden contener otros materiales diversos que modifican la forma física de la unidad de dosificación, por ejemplo, revestimientos de azúcar y otros agentes entéricos. Los compuestos también se pueden administrar como un componente de un elixir, suspensión, jarabe, oblea, cápsula dispersable, goma de mascar o similar. Un jarabe puede contener, además de los principios activos, sacarosa como un agente edulcorante y determinados conservantes, tintes y colorantes y sabores.

El anticuerpo también se puede mezclar con otros materiales activos que no alteren la acción deseada, o con materiales que complementen la acción deseada, tales como diácidos, bloqueadores de H₂, y diuréticos. El principio activo es un anticuerpo o derivado farmacéuticamente aceptable del mismo tal como se describe en el presente documento. Se pueden incluir concentraciones más elevadas, hasta aproximadamente un 98 % en peso del principio activo.

Las formulaciones de comprimidos y cápsulas se pueden revestir tal como lo conocen los expertos en la materia para modificar o mantener la disolución del principio activo. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden revestir con un revestimiento convencional digerible de forma entérica, tal como salicilato de fenilo, ceras y acetato ftalato de celulosa.

Preferentemente, las formulaciones son formas de dosificación líquida. Las formas orales de dosificación líquida incluyen soluciones acuosas, emulsiones, suspensiones, soluciones y/o suspensiones reconstituidas a partir de gránulos no efervescentes y preparaciones efervescentes reconstituidas a partir de gránulos efervescentes. Las soluciones acuosas incluyen, por ejemplo, elixires y jarabes. Las emulsiones son de aceite en agua o de agua en aceite.

Los elixires son preparaciones transparentes, edulcoradas, hidroalcohólicas. Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en los elixires incluyen disolventes. Los jarabes son soluciones acuosas concentradas de un azúcar, por ejemplo, sacarosa, y pueden contener un conservante. Una emulsión es un sistema de dos fases en el cual el líquido se dispersa en forma de glóbulos pequeños a través de otro líquido. Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en emulsiones son líquidos no acuosos, agentes emulgentes y conservantes. Las suspensiones usan agentes de suspensión farmacéuticamente aceptables y conservantes. Las sustancias farmacéuticamente aceptables usadas en gránulos no efervescentes, para reconstituir en una forma de dosificación oral líquida, incluyen diluyentes, edulcorantes y agentes humectantes. Las sustancias farmacéuticamente aceptables usadas en gránulos efervescentes, para reconstituir en una forma de dosificación oral líquida, incluyen ácidos orgánicos y una fuente de dióxido de carbono. Los agentes colorantes y saborizantes se usan en todas las formas de dosificación anteriores.

Los disolventes incluyen glicerina, sorbitol, alcohol etílico y jarabe. Ejemplos de conservantes incluyen glicerina, metilo y propilparabeno, ácido benzoico, benzoato sódico y alcohol. Ejemplos de líquidos no acuosos usados en las emulsiones incluyen aceite mineral y aceite de semilla de algodón. Ejemplos de agentes emulgentes incluyen gelatina, goma arábiga, tragacanto, bentonita, y tensioactivos tales como monooleato de polioxietileno y sorbitán. Los agentes de suspensión incluyen carboximetilcelulosa sódica, pectina, tragacanto, Veegum y goma arábiga. Los agentes edulcorantes incluyen sacarosa, jarabes, glicerina y agentes edulcorantes artificiales tales como sacarina. Los agentes humectantes incluyen monoestearato de propilenglicol, monooleato de sorbitán, monolaurato de dietilenglicol y lauril éter de polioxietileno. Los ácidos orgánicos incluyen ácido cítrico y tartárico. Las fuentes de dióxido de carbono incluyen bicarbonato sódico y carbonato sódico. Los agentes colorantes incluyen cualquiera de los colorantes de FD y C solubles en agua aprobados y certificados, y mezclas de los mismos. Los agentes saborizantes incluyen sabores naturales extraídos de plantas tales como frutas, y mezclas sintéticas de compuestos que producen una sensación de sabor agradable.

Para una forma de dosificación sólida, la solución o suspensión, por ejemplo en carbonato de propileno, aceites vegetales o triglicéridos, se puede encapsular en una cápsula de gelatina. Dichas soluciones, y la preparación y encapsulación de las mismas, se desvelan en las Patentes de Estados Unidos N° 4.328.245; N° 4.409.239; y N° 4.410.545. Para una forma de dosificación líquida, la solución, *por ejemplo*, en un polietilenglicol, se puede diluir con una cantidad suficiente de un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, agua, a medir fácilmente

para su administración.

Como alternativa, se pueden preparar formulaciones orales líquidas o semisólidas por disolución o dispersión del principio activo o sal en aceites vegetales, glicoles, triglicéridos, ésteres de propilenglicol (*por ejemplo*, carbonato de propileno) y otros de dichos vehículos, y por encapsulación de dichas soluciones o suspensiones con cubiertas para cápsulas de gelatina blanda o dura. Otras formulaciones útiles incluyen las que se establecen en las Patentes de Estados Unidos N^o RE28. 819 y N^o 4.358.603. En resumen, dichas formulaciones incluyen, pero no se limitan a, las que contienen un compuesto que se proporcionan en el presente documento, un mono- o poli- alquilen glicol dialquilado, que incluye, pero no se limita a, 1,2-dimetoximetano, diglima, triglima, tetraglima, polietilenglicol- 350- dimetil éter, polietilenglicol- 550- dimetil éter, polietilenglicol- 750- dimetil éter en los que 350, 550 y 750 hacen referencia al peso molecular medio aproximado del polietilenglicol, y uno o más antioxidantes, tales como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), galato de propilo, vitamina E, hidroquinona, hidroxycoumarinas, etanolamina, lecitina, cefalina, ácido ascórbico, ácido málico, sorbitol, ácido fosfórico, ácido tiodipropiónico y sus ésteres, y ditiocarbamatos.

Otras formulaciones incluyen, pero no se limitan a, soluciones alcohólicas acuosas que incluyen un acetal farmacéuticamente aceptable. Los alcoholes usados en estas formulaciones son cualquier disolvente miscible en agua farmacéuticamente aceptable que tenga uno o más grupos hidroxilo, que incluyen, pero no se limitan a, propilenglicol y etanol. Los acetales incluyen, pero no se limitan a, acetales de di(alquilo inferior) de aldehídos de alquilo inferior tales como de acetal dietílico de acetaldehído.

La administración parenteral caracterizada por inyección, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosa también se contempla en el presente documento. Los agentes inyectables se pueden preparar en formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas, formas salidas adecuadas para solucionar suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Los agentes inyectables, soluciones y emulsiones también contienen uno o más excipientes. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol o etanol. Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas a administrar también pueden contener cantidades más pequeñas de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulgentes, agentes para el tamponamiento del pH, estabilizantes, potenciadores de la solubilidad, y otros de dichos agentes, tales como por ejemplo, acetato sódico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina y ciclodextrinas.

La implantación de un sistema de liberación lenta o de liberación sostenida, tal como que se mantenga un nivel constante de dosificación (véase, *por ejemplo*, la Patente de Estados Unidos N^o 3.710.795) también se contempla en el presente documento. En resumen, un compuesto proporcionado el presente documento se dispersa en una matriz interna sólida, *por ejemplo*, polimetilmetacrilato, polibutilmetacrilato, cloruro de polivinilo plastificado o sin plastificar, nylon plastificado, tereftalato de polietileno plastificado, goma natural, poliisopreno, poliisobutileno, polibutadieno, polietileno, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, gomas de silicona, polidimetilsiloxanos, copolímeros de carbonato de silicona, polímeros hidrofílicos tales como hidrogeles de ésteres de ácido acrílico y metacrílico, colágeno, alcohol de polivinilo reticulado y acetato de polivinilo parcialmente hidrolizado reticulado, que está rodeada por una membrana externa, *por ejemplo*, polietileno, polipropileno, copolímeros de etileno/propileno, copolímeros de etileno/acrilato de etilo, copolímeros de etileno/acetato de vinilo, gomas de silicona, polidimetil siloxanos, goma de neopreno, polietileno clorado, cloruro de polivinilo, copolímeros de cloruro de vinilo con acetato de vinilo, cloruro de vinilideno, etileno y propileno, ionómero de tereftalato de polietileno, goma de butilo, gomas de epichlorhidrina, copolímeros de etileno/alcohol de vinilo, terpolímero de etileno/acetato de vinilo/alcohol de vinilo, y copolímeros de etileno/viniloxietanol, que es insoluble en fluidos corporales. El anticuerpo se difunde a través de la membrana polimérica más externa en una etapa de control de la velocidad de liberación. La cantidad de anticuerpo contenido en dichas composiciones parenterales es altamente dependiente de la naturaleza específica del mismo, así como de la actividad del compuesto y de las necesidades del sujeto.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones estériles listas para inyección, productos solubles séricos estériles, tales como polvos liofilizados, listos para su combinación con un disolvente justo antes de su uso, que incluyen comprimidos hipodérmicos, suspensiones estériles listas para inyección, productos insolubles secos estériles listos para su combinación con un vehículo justo antes de su uso y emulsiones estériles. Las soluciones pueden ser acuosas o no acuosas.

Si se administran por vía intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica o solución salina tamponada con fosfato (PBS), y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol, y polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados en preparaciones parenterales incluyen vehículos acuosos, vehículos no acuosos, agentes antimicrobianos, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, anestésicos locales, agentes de suspensión y de dispersión, agentes emulgentes, agentes secuestradores o quelantes y otras sustancias farmacéuticamente aceptables.

Ejemplos de vehículos acuosos incluyen Inyección de Cloruro Sódico, Inyección de Ringers, Inyección de Dextrosa Isotónica, Inyección de Agua Estéril, Dextrosa e Inyección de Ringers Lactatada. Los vehículos parenterales no acuosos incluyen aceites fijos de origen vegetal, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo y aceite de cacahuete. Los agentes antimicrobianos en concentraciones bacteriostáticas o fungiestáticas se pueden
 5 añadir a preparaciones parenterales envasadas en envases de dosis múltiples que incluyen fenoles o cresoles, agentes mercuriales, alcohol de bencilo, clorobutanol, metilo y ésteres del ácido propil p-hidroxibenzoico, timerosal, cloruro de benzalconio y de cloruro benzetonio. Los agentes isotónicos incluyen cloruro sódico y dextrosa. Los tampones incluyen fosfato y citrato. Los antioxidantes incluyen bisulfato sódico. Los anestésicos locales incluyen clorhidrato de procaína. Los agentes de suspensión y dispersión incluyen carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropil
 10 metilcelulosa y polivinilpirrolidona. Los agentes emulgentes incluyen Polisorbato 80 (TWEEN® 80). Un agente secuestrante o quelante de iones metálicos incluye EDTA. Los vehículos farmacéuticos también incluyen alcohol etílico, polietilenglicol y propilenglicol para vehículos miscibles en agua; e hidróxido sódico, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido láctico para ajuste del pH.

15 La concentración del compuesto farmacéuticamente activo se ajusta de modo que una inyección proporciona una cantidad eficaz para producir el efecto farmacológico deseado. La dosis exacta depende de la edad, peso y afección del paciente o animal tal como se conoce en la técnica.

Las preparaciones parenterales de dosificación individual se pueden envasar en una ampolla, un vial o una jeringa
 20 con una aguja. Todas las preparaciones para administración parenteral pueden ser estériles, tal como se conoce y se practica en la técnica.

Como ilustración, la infusión intravenosa o intraarterial de una solución acuosa estéril que contiene un principio
 25 activo es un modo eficaz de administración. Otra realización es una solución o suspensión estéril acuosa u oleosa que contiene un material activo inyectado si fuera necesario para producir el efecto farmacológico deseado.

Los agentes inyectables se diseñan para administración local y sistémica. En una realización, una dosificación
 30 terapéuticamente eficaz se formula para contener una concentración de al menos aproximadamente un 0,1 % p/p hasta aproximadamente un 90 % p/p o más, en determinadas realizaciones más de un 1 % p/p del principio activo para tratar tejido o tejidos.

El anticuerpo se puede suspender en forma micronizada u otra forma adecuada. La forma de la mezcla resultante
 35 depende de un número de factores, que incluyen el modo de administración previsto y la solubilidad del compuesto en el medio de soporte o vehículo. La concentración eficaz es suficiente para mejorar los síntomas de la afección y se puede determinar empíricamente.

Las formulaciones farmacéuticas pueden ser polvos liofilizados, que se pueden reconstituir su administración como
 soluciones, emulsiones y otras mezclas. También se pueden reconstituir y formular como sólidos o geles.

40 El polvo liofilizado se prepara por disolución de un anticuerpo que se proporcionan el presente documento, o un derivado farmacéuticamente aceptable del mismo, en un disolvente adecuado. El polvo liofilizado puede ser estéril. El disolvente puede contener un excipiente que mejora la estabilidad u otro componente farmacológico del polvo o
 45 solución reconstituida, preparado a partir del polvo. Los excipientes que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, dextrosa, sorbital, fructosa, jarabe de maíz, xilitol, glicerina, glucosa, sacarosa u otro agente adecuado. El disolvente también puede contener un tampón, tal como citrato, fosfato sódico o potásico voto tampón mencionado conocido por los expertos en la materia, en una realización, a pH aproximadamente neutro. La filtración estéril
 50 posterior de la solución seguida de liofilización en condiciones convencionales conocidas por los expertos en la materia proporciona la formulación deseada. En una realización, la solución resultante se repartirá en viales para liofilización. Cada vial contendrá una sola dosificación o dosificaciones múltiples del compuesto. El polvo liofilizado se puede almacenar en condiciones apropiadas, tales como de aproximadamente 4 °C a temperatura ambiente.

La reconstitución de este polvo liofilizado con agua para inyección proporciona una formulación para uso en la
 55 administración parenteral. La reconstitución, el polvo liofilizado se añade agua estéril o a otro vehículo adecuado. La cantidad precisa depende del compuesto seleccionado. Dicha cantidad se puede determinar empíricamente.

Las mezclas tópicas se preparan tal como se describe para la administración local y sistémica. La mezcla resultante
 60 puede ser una solución, suspensión, emulsiones o similares y se pueden formular como cremas, geles, pomadas, emulsiones, soluciones, elixires, nociones, suspensiones, tinturas, pastas, espumas, aerosoles, irrigaciones, pulverizaciones, supositorios, apósitos, parches térmicos o cualquier otra formulación adecuada para administración tópica.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden formular como aerosoles para aplicación tópica, tal como por
 65 inhalación (véase, *por ejemplo*, las Patentes de Estados Unidos N° 4.044.126, N° 4.414.209, y N° 4.364.923, que describe aerosoles para administración de un esteroide útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, particularmente asma). Estas formulaciones para administración al tracto respiratorio pueden estar en forma de un aerosol o solución para un nebulizador, o como un polvo microfino para insufflaciones, solo o en combinación con un

vehículo inerte tal como lactosa. En dicho caso, las partículas de la formulación, en una realización, tendrán diámetros inferiores a 50 micrómetros, en una realización inferiores a 10 micrómetros.

5 Los compuestos se pueden formular para aplicación local o tópica, tal como para aplicación tópica a la piel y a las membranas mucosas, tal como en el ojo, en forma de geles, cremas, y lociones y para aplicación al ojo o para aplicación intracisternal o intraespinal. La administración tópica se contempla para la administración transdérmica y también para la administración a los ojos o mucosa, o para terapias de inhalación. También se pueden administrar soluciones nasales del principio activo solo o en combinación con otros excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 Estas soluciones, particularmente las previstas para uso oftálmico, se pueden formular como soluciones isotónicas al 0,01 % - 10 %, pH aproximadamente 5-7, con sales apropiadas.

En el presente documento también se contemplan otras vías de administración, tales como parches transdérmicos, que incluyen dispositivos iontoforéticos y electroforéticos, y administración rectal.

15 Los parches transdérmicos, que incluyen dispositivos iontoforéticos y electroforéticos, son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, dichos parches se desvelan en Patentes de Estados Unidos N° 6.267.983, N° 6.261.595, N° 6.256.533, N° 6.167.301, N° 6.024.975, N° 6.010.715, N° 5.985.317, N° 5.983.134, N° 5.948.433, y N° 5.860.957.

20 Por ejemplo, las formas de dosificación farmacéutica para administración rectal son supositorios rectales, cápsulas y comprimidos para efecto sistémico. Los supositorios rectales usados en el presente documento se refieren a cuerpos sólidos para inserción en el recto que se funden o se ablandan a la temperatura corporal liberando uno o más principios farmacológicamente o terapéuticamente activos. Las sustancias farmacéuticamente aceptables usadas en
25 supositorios rectales son bases o vehículos y agentes para elevar el punto de fusión. Ejemplos de bases incluyen manteca de cacao (aceite de teobroma), glicerina-gelatina, carbocera (polioxietilenglicol) y mezclas apropiadas de mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Se pueden usar combinaciones de las diversas bases. Los agentes para elevar el punto de fusión de los supositorios incluyen esperma de ballena y cera. Los supositorios rectales se pueden preparar mediante el método de compresión o por moldeo. El peso de un supositorio rectal, en una realización, es de
30 aproximadamente 2 a 3 g.

Los comprimidos y cápsulas para administración rectal se pueden preparar usando la misma sustancia farmacéuticamente aceptable y mediante los mismos métodos tal como formulaciones para administración oral.

35 Los anticuerpos y otras composiciones que se proporcionan en el presente documento también se pueden formular para su dirección a un tejido, receptor, u otra área en particular del organismo del sujeto a tratar. Muchos de dichos métodos de dirección son bien conocidos por los expertos en la materia. Todos los métodos mencionados de dirección se contemplan en el presente documento para uso en las composiciones presentes. Para ejemplos no limitantes de métodos de dirección, véanse, por *ejemplo*, las Patentes de Estados Unidos N° 6.316.652, N°
40 6.274.552, N° 6.271.359, N° 6.253.872, N° 6.139.865, N° 6.131.570, N° 6.120.751, N° 6.071.495, N° 6.060.082, N° 6.048.736, N° 6.039.975, N° 6.004.534, N° 5.985.307, N° 5.972.366, N° 5.900.252, N° 5.840.674, N° 5.759.542 y N° 5.709.874. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-hLIGHT de la presente divulgación se dirigen (o se administran de otro modo) al colon, tal como en un paciente que parece no estar en riesgo de padecer una IBD.

45 Las suspensiones liposomales, que incluye liposomas dirigidos a tejidos, tales como liposomas dirigidos a tumores, también pueden ser adecuados como vehículos farmacéuticamente aceptables. Éstos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se pueden preparar formulaciones de liposomas tal como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.522.811. En resumen, los liposomas tales como vesículas multilamelares (MLV) se pueden formar mediante secado de fosfatidilcolina de huevo y fosfatidil
50 serina de cerebro (relación molar de 7:3) en el interior de un matraz. Se añade una solución de un compuesto que se proporciona en el presente documento en solución salina tamponada con fosfato que carece de cationes divalentes (PBS) y el matraz se agita hasta que la película lipídica se dispersa. Las vesículas resultantes se lavan para retirar compuesto encapsulado, se microgranulan por centrifugación, y a continuación se vuelven a suspender en PBS.

55 Métodos de administración y dosificación

La presente divulgación también proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos que se describen en el presente documento para su uso la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT (o síntoma de la misma).

60 En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la presente divulgación para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT, tal como IBD (*por ejemplo*, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn), o un síntoma de la misma. Los síntomas de IBD pueden variar de moderados a graves y generalmente dependen de la parte del tracto intestinal implicada. Los síntomas a modo de ejemplo de IBD incluyen calambres y dolor abdominal, diarrea con sangre,
65 urgencia grave para tener un movimiento intestinal, fiebre, pérdida de apetito, pérdida de peso, anemia, fatiga, y/o

llagas en la parte baja de las piernas, tobillos, pantorrillas, muslos, y brazos. Complicaciones intestinales a modo de ejemplo de IBD incluyen hemorragia profusa de las úlceras, perforación o ruptura del intestino, estenosis y obstrucción, fístulas (pasaje anormal) y enfermedades perianales, megacolon tóxico (*por ejemplo*, dilatación no obstructiva aguda del colon), y/o malignidad (*por ejemplo*, cáncer de colon o del intestino delgado). Complicaciones extraintestinales a modo de ejemplo de IBD incluyen artritis, afecciones de la piel, inflamación de los ojos, trastornos hepáticos y renales, y/o pérdida de masa ósea. Cualquier combinación de estos síntomas se puede prevenir, dirigir, tratar, y/o mejorar usando las composiciones y métodos que se proporcionan en el presente documento.

En el presente documento se proporcionan composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la presente divulgación para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT, tal como GVHD, o un síntoma de la misma. GVHD se produce generalmente después de trasplantes de médula ósea no relacionados alogénicos o combinados (BMT).

La GVHD que se describen en el presente documento puede ser GVHD aguda. Los síntomas de GVHD aguda pueden ocurrir rápidamente y pueden ser leves o severos. En determinados casos, la GVHD aguda se desarrolla dentro de aproximadamente tres meses después del trasplante, por ejemplo cuando los recuentos sanguíneos se recuperan después del trasplante. En determinados casos, la GVHD aguda afecta a la piel, al tracto gastrointestinal (GI) y/o al hígado. Por ejemplo, en algunos pacientes, la GVHD de piel aguda comienza con una erupción, por ejemplo, en las palmas de las manos del paciente, plantas de los pies, u hombros. Sin embargo, la erupción se puede llegar a generalizar, y puede causar picazón y dolor y/o podría causar ampollas y exfoliación. La GVHD hepática aguda puede afectar a las funciones normales del hígado, tales como enzimas hepáticas, y a su vez, puede causar ictericia. La GVHD hepática aguda también puede provocar que el abdomen del paciente se llegue a hinchar y duela si el hígado se hace más grande. Finalmente, los síntomas de la GVHD intestinal aguda (o GVHD del sistema digestivo) pueden incluir diarrea, moco o sangre en las heces, calambre o dolor abdominal, indigestión, náuseas y/o pérdida de apetito. Otros síntomas generales de la GVHD aguda pueden incluir anemia, fiebre baja, y/o ser más propenso a las infecciones. Cualquier combinación de estos síntomas de GVHD aguda se puede prevenir, dirigir, tratar, y/o mejorar usando las composiciones y métodos que se proporcionan en el presente documento.

La GVHD que se describen en el presente documento puede ser GVHD crónica. La GVHD crónica se puede producir de aproximadamente tres meses a aproximadamente un año o más después del trasplante. La GVHD crónica puede ser leve o grave, y generalmente incluye síntomas similares a los de la GVHD aguda. La GVHD crónica puede afectar a la piel y al sistema digestivo, incluyendo al hígado pero también puede implicar a otros órganos y al sistema inmune (*por ejemplo*, haciendo al paciente más propenso a las infecciones) y/o tejidos conectivos. Los síntomas de la GVHD de piel crónica incluyen erupción, piel seca, tirantez en la piel, picor en la piel, oscurecimiento del color de la piel, engrosamiento de la piel, y/o puede aceptar al pelo (*por ejemplo*, pérdida capilar, se vuelve gris) o uñas (*por ejemplo*, uñas duras o quebradizas). La GVHD intestinal crónica puede afectar al sistema digestivo, boca, esófago, revestimiento del estómago, y/o revestimiento del intestino, y los síntomas pueden incluir diarrea, boca seca o dolorida, dolor al tragar, baja absorción de nutrientes por el estómago, distensión abdominal, calambres estomacales. La GVHD hepática crónica puede provocar daño y cicatrización del hígado (cirrosis). La GVHD crónica de los ojos puede afectar las glándulas que producen las lágrimas, provocando que los ojos se queden secos, ardor y dolor o dificultad para tolerar la luz brillante. La GVHD pulmonar crónica puede provocar dificultad para respirar, respiración sibilante, tos persistente, y/o hacerse más propenso a las infecciones en el pecho. La GVHD crónica afecta a los tendones (*por ejemplo*, inflamación) que conectan el músculo al hueso causando dificultad para estirar o doblar los brazos y piernas. Cualquier combinación de estos síntomas de GVHD crónica se puede prevenir, dirigir, tratar, y/o mejorar usando las composiciones y métodos que se proporcionan en el presente documento.

Una composición que se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo E1, E13, E63, F19, y/o F23. Una composición que se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneNº de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23). Una composición que se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un fragmento de unión a antígenos de un anticuerpo E1, E13, E63, F19, y/o F23. Una composición que se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un fragmento de unión a antígenos de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneNº de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23).

Una composición que se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender uno o más anticuerpos que comprenden uno o más dominios de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios de VH representados en las SEC ID Nº: 1, 2, 3, 4 o 5, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneNº de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23). Una composición que se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR1 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR1 de VH representado en

las SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23 (*es decir*, las CDR1 de VH del VH representado en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente), o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23). Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR2 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR2 de VH representado en las SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24 (*es decir*, las CDR2 de VH del VH representado en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente), o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23). Preferentemente, una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR3 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR3 de VH representado en las SEC ID N°: 13, 16, 19, 22, o 25 (*es decir*, las CDR3 de VH del VH representado en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente), o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23).

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender uno o más anticuerpos que comprenden uno o más dominios de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios de VL representados en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23). Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR1 de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR1 de VL representadas en las SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 93, 35, 94, 95, o 38 (*es decir*, las CDR1 de VL del VL representado en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10, respectivamente), o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23). Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR2 de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR2 de VL representadas en las SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39 (*es decir*, las CDR2 de VL del VL representado en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10, respectivamente); o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23). Preferentemente una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR3 de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR3 de VL representadas en las SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101, o 40 (*es decir*, las CDR3 de VL del VL representado en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10, respectivamente); o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23).

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más dominios de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios de VH representados en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23), y uno o más dominios de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de los dominios de VL representados en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10, o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23).

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT comprende uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR1 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR1 de VH representado en las SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23 (*es decir*, las CDR1 de VH del VH representado en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente), o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23), y una o más CDR1 de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR1 de VL representadas en las SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 93, 35, 94, 95, o 38 (*es decir*, las CDR1 de VL del VL representado en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10, respectivamente), o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23). Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR1 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR1 de VH representado en las SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23 (*es decir*, las CDR1 de VH del VH representado en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente), o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN° de Acceso PTA-7729, PTA-7842,

7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23). Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender uno o más anticuerpos que comprenden una o más CDR3 de VH que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR3 de VH representadas en las SEC ID N^o: 13, 16, 19, 22, o 25 (*es decir*, las CDR3 de VH del VH representado en las SEC ID N^o: 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente), o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN^o de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23), y una o más CDR3 de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR3 de VL que tienen una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR3 de VL representadas en las SEC ID N^o: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101, o 40 (*es decir*, las CDR3 de VL del VL representadas en las SEC ID N^o: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10, respectivamente), o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tieneN^o de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23).

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio de VH representado en una cualquiera de las SEC ID N^o: 1, 2, 3, 4 o 5 y/o un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio de VL representado en una cualquiera de las SEC ID N^o: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, o 10.

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende (a) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N^o: 1 y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N^o: 82, 6 o 83; (b) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N^o: 2 y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N^o: 7; (c) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N^o: 3 y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N^o: 8; (d) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N^o: 4 y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N^o: 90, 9, 91 o 92; o (e) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N^o: 5 y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEC ID N^o: 10. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio de VH de un anticuerpo que tienenN^o de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente) y/o un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio de VL de un anticuerpo que tieneN^o de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente).

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende (a) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N^o de Acceso PTA-7729 de la ATTC (E1) y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N^o de Acceso PTA-7729 de la ATTC (E1); (b) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N^o de Acceso PTA-7842 de la ATTC (E13) y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N^o de Acceso PTA-7842 de la ATTC (E13); (c) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N^o de Acceso PTA-7818 de la ATTC (E63) y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N^o de Acceso PTA-7818 de la ATTC (E63); (d) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N^o de Acceso PTA-7819 de la ATTC (F19) y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N^o de Acceso PTA-7819 de la ATTC (F19); o (e) un dominio de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N^o de Acceso PTA-7728 de la ATTC (F23) y un dominio de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo que tiene N^o de Acceso PTA-7728 de la ATTC (F23). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VH de una cualquiera de las regiones de VH representadas en las SEC ID N^o: 1, 2, 3, 4 o 5. Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VH de una cualquiera de las regiones de VH representadas

en SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4 o 5. Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de the CDR3 de VH de una cualquiera de las regiones de VH representadas en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5. Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende una CDR1 de VH y/o una CDR2 de VH y/o una CDR3 de VH seleccionada independientemente entre una CDR1 de VH, CDR2 de VH, CDR3 de VH tal como se representa en una cualquiera de las regiones del VH representadas en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5.

La presente divulgación también proporciona una composición para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT que comprende un anticuerpo que se une de forma inespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende una o más CDR de VL (*es decir*, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL) que tienen una secuencia de aminoácidos de uno cualquiera de las CDR de VL (*es decir*, CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL) de E1, E13, E63, F19, y/o F23; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente); o cualquier combinación de los mismos.

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende (1) un dominio de VH que tiene (a) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 11, 12 y/o 13, respectivamente, (b) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 14, 15 y/o 16, respectivamente, (c) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 17, 18, y/o 19, respectivamente, (d) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 20, 21 y/o 22, respectivamente, o (e) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 23, 24 y/o 24, respectivamente, y/o (2) un dominio de VL que tiene (a) una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 84, 26 o 85; una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 86, 27, o 87; y/o una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 88, 28, o 89, (b) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 29, 30 y/o 31, respectivamente, (c) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 32, 33 y/o 34, respectivamente, (d) una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 93, 35, 94, o 95; una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 96, 36, 97, o 98; y/o una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 96, 36, 97, o 98, o (e) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 38, 39 y/o 40, respectivamente. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende (1) un dominio de VH que tiene (a) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7729 de la ATTC (E1), (b) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7842 de la ATTC (E13), (c) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7818 de la ATTC (E63), (d) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC (F19), o (e) una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7728 de la ATTC (F23), y/o (2) un dominio de VL que tiene (a) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7729 de la ATTC (E1), (b) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7842 de la ATTC (E13), (c) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7818 de la ATTC (E63), (d) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC (F19), o (e) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7728 de la ATTC (F23). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo

monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende (1) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 11, 12 y/o 13, respectivamente, y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 84, 26 o 85; una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 86, 27, o 87; y/o una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 88, 28, o 89; (2) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 14, 15 y/o 16, respectivamente, y (b) una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 29, 30 y/o 31, respectivamente; (3) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 17, 18, y/o 19, respectivamente, y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 32, 33 y/o 34, respectivamente; (4) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 20, 21 y/o 22, respectivamente, y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 93, 35, 94, o 95; una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 96, 36, 97, o 98; y/o una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en una cualquiera de las SEC ID N°: 96, 36, 97, o 98; o (5) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NOS:23, 24 y/o 24, respectivamente, y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos representada en las SEC ID N°: 38, 39 y/o 40, respectivamente. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende (1) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7729 de la ATTC (E1), y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7729 de la ATTC (E1); (2) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7842 de la ATTC (E13) y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7842 de la ATTC (E13); (3) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7818 de la ATTC (E63) y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7818 de la ATTC (E63); (4) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC (F19) y una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC (F19); o (5) (a) un dominio de VH que tiene una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH, CDR2 de VH, y/o CDR3 de VH de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7728 de la ATTC (F23) y (b) un dominio de VL que tiene una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VL, CDR2 de VL, y/o CDR3 de VL de un anticuerpo que tiene N° de Acceso PTA-7728 de la ATTC (F23). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de the CDR1 de VL de una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente). Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inmunespecífica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de VL de una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-

7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente). Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de VL de una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un híbrido que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente). Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende una CDR1 de VL y/o una CDR2 de VL y/o una CDR3 de VL seleccionada independientemente entre la CDR1 de VL, CDR2 de VL, CDR3 de VL tal como se representa en una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un híbrido que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente).

Una composición tal como se describe en el presente documento para su uso la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT puede comprender un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende un (1) dominio o cadena de VH que tiene una o más de (a) una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR1 de VH de una cualquiera de las regiones de VH representadas en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5; o de un anticuerpo producido por un híbrido que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), (b) una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VH de una cualquiera de las regiones de VH representadas en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5; o de un anticuerpo producido por un híbrido que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), o (c) una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VH de una cualquiera de las regiones de VH representadas en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 o 5; o de un anticuerpo producido por un híbrido que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente); y/o (2) un dominio o cadena de VL que tiene una o más de (a) una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de VL de una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un híbrido que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), (b) una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR2 de VL de una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un híbrido que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente), y/o (c) una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de VL de una cualquiera de las regiones de VL representadas en las SEC ID N°: 82, 6, 83, 7, 8, 90, 9, 91, 92, o 10; o de un anticuerpo producido por un híbrido que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23, respectivamente).

La presente divulgación también proporciona una composición para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT que comprende un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende una o más CDR de VH y una o más CDR de VL que se enumeran en la Tabla I. En particular, la presente divulgación proporciona una composición para su uso en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT que comprende un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT, en la que dicho anticuerpo comprende una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23) y una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38); CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, o 39); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23); una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una VH1 de CDR1, una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40).

40); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 15, 18, 21 o 24), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 5, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 5, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEQ ID NOS: 13, 16, 19, 22 o 25) y una CDR3 de VL (SEQ ID NOS: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 5, 18, 21 o 24), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 5, 18, 21 o 24), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 5, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 5, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 5, 18, 21 o 24), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38) y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR2 de VH (SEC ID N°: 12, 5, 18, 21 o 24), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38), una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39), y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); una CDR1 de VH (SEC ID N°: 11, 14, 17, 20, o 23), una CDR3 de VH (SEC ID N°: 13, 16, 19, 22 o 25), una CDR1 de VL (SEC ID N°: 84, 26, 85, 29, 32, 35 o 38), una CDR2 de VL (SEC ID N°: 86, 27, 87, 30, 33, 96, 36, 97, 98, o 39), y una CDR3 de VL (SEC ID N°: 88, 28, 89, 31, 34, 99, 37, 100, 101 o 40); o cualquier combinación de los mismos de las CDR de VH (SEC ID N°: 11-25) y las CDR de VL (SEC ID N°: 26- 40) enumeradas en la Tabla I. Las correspondientes CDR de VH y CDR de VL de N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19, o F23), también se pueden usar cualquiera de las combinaciones que se han enumerado anteriormente. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, tal como un anticuerpo monoclonal totalmente humano, y/o un anticuerpo antagonista de hLIGHT.

Tal como se analiza con más detalle en cualquier parte en el presente documento, una composición de la presente divulgación se puede usar sola o en combinación con otros compuestos o composiciones. Además, los anticuerpos se pueden condensar adicionalmente de forma recombinante con un polipéptido heterólogo en el extremo N o C o conjugar químicamente (incluyendo conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden condensar se forma recombinante o conjugar con moléculas útiles como marcas en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radio nucleótidos, o toxinas. Véanse, *por ejemplo*, las publicaciones de PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la Patente de Estados Unidos N° 5.314.995; y el documento EP 396.387.

En el presente documento se proporcionan métodos para disminuir o inhibir la unión de hLIGHT a HVEM, LT β R y/o DcR3 en un sujeto (*por ejemplo*, un sujeto humano), que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble). El hLIGHT puede ser una variante de SNP de hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L o 214K-32L. Una actividad biológica de hLIGHT, tal como secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, también se puede disminuir o inhibir en el sujeto.

En el presente documento se proporcionan métodos para disminuir o inhibir una actividad biológica de hLIGHT, tal como secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, en un sujeto (*por ejemplo*, un sujeto humano), que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular), en los que la actividad biológica de hLIGHT se ve disminuida o inhibida por el anticuerpo. El hLIGHT puede ser una variante de SNP de hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L o 214K-32L.

En el presente documento se proporcionan métodos para disminuir o inhibir la unión de hLIGHT a HVEM, LT β R y/o DcR3 en una célula que tiene hLIGHT expresado en la superficie celular, poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble), tal como un polipéptido de hLIGHT, un fragmento de polipéptido de hLIGHT, o un epítipo de hLIGHT. El hLIGHT puede ser una variante de SNP de hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L o 214K-32L. Una actividad biológica de hLIGHT, tal como secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, también se puede disminuir o inhibir en la célula.

En el presente documento se proporcionan métodos para disminuir o inhibir una actividad biológica de hLIGHT, tal como secreción de CCL20, IL8 y/o RANTES, en una célula que tiene un receptor de hLIGHT expresado en la superficie celular (tal como, HVEM, LT β R y/o Dc3R), poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une de forma inmuno-específica a un polipéptido de hLIGHT (*por ejemplo*, un hLIGHT expresado en la superficie celular o soluble) en los que la actividad biológica de hLIGHT se ve disminuida o inhibida por el anticuerpo. El hLIGHT puede ser una variante de SNP de hLIGHT, tal como 214E-32S, 214K-32S, 214E-32L o 214K-32L.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden usar, por ejemplo, para purificar, detectar, y dirigir antígenos de hLIGHT, en métodos de diagnóstico y terapéuticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos modificados tienen uso en inmunoensayos para medir cualitativamente y cuantitativamente los niveles de hLIGHT en muestras biológicas. Véase, *por ejemplo*, Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^a ed. 1988).

La presente divulgación también proporciona métodos para prevenir, dirigir, tratar y/o mejorar una enfermedad mediada por hLIGHT mediante la administración a un sujeto de una cantidad eficaz de un anticuerpo, o composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la presente divulgación. Un anticuerpo que se describe en el presente documento puede estar básicamente purificado (*es decir*, básicamente libre de sustancias que limitan su efecto o que producen efectos secundarios no deseados). Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal totalmente humano, tal como un anticuerpo antagonista monoclonal totalmente humano. El sujeto al que se administra una terapia es preferentemente un mamífero tal como un no primate (*por ejemplo*, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas *etc.*) o un primate (*por ejemplo*, un mono, tal como un mono *cinomolgo*, o un ser humano). Preferentemente, el sujeto es un ser humano. Preferentemente, el sujeto es un niño humano o un niño humano nacido prematuramente. El sujeto puede ser un ser humano con una enfermedad mediada por hLIGHT.

Diversos sistemas de administración son conocidos y se pueden usar para administrar un agente profiláctico o terapéutico (*por ejemplo*, un anticuerpo de la presente divulgación), que incluye, pero no se limita a, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo, endocitosis mediada por receptores (véase, *por ejemplo*, Wu y Wu, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432 (1987)), construcción de un ácido nucleico como parte de un retrovirus u otro vector, *etc.* Métodos para administrar un agente profiláctico o terapéutico (*por ejemplo*, un anticuerpo de la presente divulgación), o composición farmacéutica incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (*por ejemplo*, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural, y mucosal (*por ejemplo*, vías intranasal y oral). Un agente profiláctico o terapéutico (*por ejemplo*, un anticuerpo de la presente divulgación), o una composición farmacéutica se puede administrar por vía intranasal, por vía intramuscular, por vía intravenosa, o por vía subcutánea. Los agentes o composiciones profilácticos o terapéuticos se pueden administrar mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección de bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (*por ejemplo*, mucosa oral, mucosa intranasal, mucosa rectal e intestinal, *etc.*) y se pueden administrar en conjunto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, se puede usar administración pulmonar, *por ejemplo*, mediante el uso de un inhalador nebulizador, y formulación con un agente para aerosol. Véanse, *por ejemplo*, las Patentes de Estados Unidos N^o 6.019.968, N^o 5.985.320, N^o 5.985.309, N^o 5.934.272, N^o 5.874.064, N^o 5.855.913, N^o 5.290.540, y N^o 4.880.078; y las Publicaciones de PCT N^o WO 92/19244, N^o WO 97/32572, N^o WO 97/44013, N^o WO 98/31346, y N^o WO 99/66903.

Puede ser deseable administrar un agente profiláctico o terapéutico, o una composición farmacéutica de la presente divulgación localmente al área con necesidad de tratamiento. Esto se puede conseguir, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local, por administración tópica (*por ejemplo*, por pulverización intranasal), por inyección, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, que incluye membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Preferentemente, cuando se administran un anticuerpo de la presente divulgación, se debe tener cuidado de usar materiales a los que el anticuerpo no se absorbe.

Un agente profiláctico o terapéutico, o una composición de la presente divulgación se puede administrar en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, 1990, Science 249: 1527-1533; Treat y col., en Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, páginas 353- 365 (1989); Lopez-Berestein, en el mismo lugar., páginas 317-327; véase generalmente en el mismo lugar.).

5 Un agente profiláctico o terapéutico, o una composición de la presente divulgación se puede administrar en un sistema de liberación controlada o de liberación sostenida. En una realización, se puede usar una bomba para conseguir liberación controlada o sostenida (véase Langer, *anteriormente*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 20; Buchwald y col., 1980, Surgery 88: 507; Saudek y col., 1989, N. Engl. J. Med. 321: 574). Se pueden
10 usar materiales poliméricos para conseguir liberación controlada o sostenida de un agente profiláctico o terapéutico (*por ejemplo*, un anticuerpo de la presente divulgación) o una composición de la presente divulgación (véase *por ejemplo*, Medical Applications of Controlled Release Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61; véase también Levy y col., 1985,
15 Science 228: 190; Doring y col., 1989, Ann. Neurol. 25: 351; Howard y col., 1989, J. Neurosurg. 7 1: 105); Patente de Estados Unidos N° 5.679.377; Patente de Estados Unidos N° 5.916.597; Patente de Estados Unidos N° 5.912.015; Patente de Estados Unidos N° 5.989.463; Patente de Estados Unidos N° 5.128.326; Publicación de PCT N° WO 99/15154; y Publicación de PCT N° WO 99/20253. Ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero no se limitan a, poli (metacrilato 2-hidroxietilo), poli (metacrilato de metilo), poli (ácido acrílico), poli (etileno-co- acetato de vinilo), poli (ácido acrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli (N-vinil pirrolidona), poli (alcohol de vinilo), poli(acrilamida, poli (etilenglicol), polilactidas (PLA), poli (lactida-co-glicólidos) (PLGA), y polioctoésteres. Preferentemente, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, libre de impurezas lixiviables, estable al almacenamiento, estéril, y biodegradable. Un sistema de liberación controlada o sostenida tal como se describe en el presente documento se puede colocar en proximidad de la diana
20 terapéutica, es decir, los pasajes nasales o pulmones, requiriendo de este modo solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, *por ejemplo*, Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, léase anteriormente, vol. 2, páginas 115-138 (1984)). Los sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer (1990, Science 249: 1527-1533). Se puede usar cualquier técnica conocida por un experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más anticuerpos de la presente divulgación. Véase, *por ejemplo*,
30 Patente de Estados Unidos N° 4.526.938, publicación de PCT WO 91/05548, publicación de PCT WO 96/20698, Ning y col., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel, "Radiotherapy & Oncology 39: 179- 189, Song y col., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long- Circulating Emulsions, "PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50: 372- 397, Cleek y col., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application, "Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24: 853-854, y Lam y col., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery, " Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24: 759- 760.

40 Cuando la composición de la presente divulgación es un ácido nucleico que codifica un agente profiláctico o terapéutico (*por ejemplo*, un anticuerpo de la presente divulgación), el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su agente profiláctico o terapéutico codificado, construyendo como parte de un vector de expresión de ácidos nucleicos apropiado y administrándolo de modo que se haga intracelular, *por ejemplo*, mediante el uso de un vector retroviral (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.980.286), o por inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de microparticulas (*por ejemplo*, una pistola genética; Biolistic, Dupont), o revestimiento con lípidos por receptores de superficie celular o agentes de transfección, o mediante su
45 administración en unión a un péptido de tipo homeobox que sabe que entra en el núcleo (véase, *por ejemplo*, Joliot y col., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864-1868), *etc.* Como alternativa, un ácido nucleico se puede introducir por vía intracelular e incorporar dentro del ADN de la célula huésped para expresión por recombinación homóloga.

50 Una composición de la presente divulgación puede comprender uno, dos o más anticuerpos de la presente divulgación. Una composición de la presente divulgación puede comprender uno, dos o más anticuerpos tal como se describe en el presente documento y un agente profiláctico o terapéutico distinto de un anticuerpo tal como se describe en el presente documento. Preferentemente, se sabe que los agentes son útiles para o han sido o actualmente se usan para la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT. Además de agentes profilácticos o terapéuticos, las composiciones de la presente divulgación también pueden comprender un vehículo.

60 Las composiciones de la presente divulgación pueden incluir composiciones de fármacos a granel útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas (por ejemplo, composiciones que son adecuadas para la administración a un sujeto o paciente) que se pueden usar en la preparación de formas de dosificación individual. Una composición de la presente divulgación puede ser una composición farmacéutica. Dichas composiciones comprenden una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz de uno o más agentes profilácticos o terapéuticos (*por ejemplo*, un anticuerpo de la presente divulgación u otro agente profiláctico o terapéutico), y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas se formulan para que sean adecuadas para la vía administración de administración a un sujeto.

65

El término "medio de soporte" puede hacer referencia a un diluyente, adyuvante (*por ejemplo*, adyuvante de Freund (completo e incompleto)), excipiente, o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Dichos medios de soporte farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, que incluyen los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un medio de soporte preferente cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también se pueden usar como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también debe contener cantidades más pequeñas de agentes humectantes o emulgentes, o agentes para tamponamiento del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, *etc.* Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA. Dichas composiciones contendrán una cantidad profilácticamente o terapéuticamente eficaz del anticuerpo, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo con el fin de proporcionar la forma de administración apropiada para el paciente. La formulación se debería de ajustar al modo de administración.

Preferentemente, la composición se formula de acuerdo con procedimientos de rutina tal como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Por lo general, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de inyección. Estas composiciones, sin embargo, se pueden administrar mediante una vía distinta a la intravenosa.

Generalmente, los ingredientes de las composiciones de la presente divulgación se suministran separadamente o se mezclan en conjunto en forma de dosificación individual, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un envase cerrado herméticamente tal como una ampolla o sobrecito que indica la cantidad del principio activo. Cuando la composición se va administrar por infusión, se puede dispensar con una botella para infusión que contienen agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

La presente divulgación también proporciona que un anticuerpo que se describe en el presente documento se envasa en un envase cerrado herméticamente tal como una ampolla o bolsita indicando la cantidad de anticuerpo. El anticuerpo se puede proporcionar como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado sin agua en un envase cerrado herméticamente y se puede reconstituir, *por ejemplo*, con agua o solución salina a la concentración apropiada para su administración a un sujeto. Preferentemente, el anticuerpo se proporciona como un polvo liofilizado estéril seco en un envase cerrado herméticamente a una dosificación individual de al menos 0,1 mg, al menos 0,5 mg, al menos 1 mg, al menos 2 mg, o al menos 3 mg, y más preferentemente al menos 5 mg, al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 30 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg, al menos 60 mg, al menos 75 mg, al menos 80 mg, al menos 85 mg, al menos 90 mg, al menos 95 mg, o al menos 100 mg. El anticuerpo liofilizado se puede almacenar a entre 2 y 8 °C en su envase original y el anticuerpo se puede administrar en 12 horas, preferentemente en 6 horas, en 5 horas, en 3 horas, o en 1 hora después de haber sido reconstituido. Un anticuerpo tal como se describe en el presente documento se puede proporcionar en forma líquida en un envase cerrado herméticamente indicando la cantidad y concentración del anticuerpo. Preferentemente, la forma líquida del anticuerpo se proporciona en un envase cerrado herméticamente de al menos 0,1 mg/ml, al menos 0,5 mg/ml, o al menos 1 mg/ml, y más preferentemente al menos 5 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 25 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 60 mg/ml, al menos 70 mg/ml, al menos 80 mg/ml, al menos 90 mg/ml, o al menos 100 mg/ml.

Las composiciones de la presente divulgación se pueden formular como formas mientras neutrales o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como los que derivan de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, *etc.*, y las formadas con cationes tales como los que derivan de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, *etc.*

La cantidad de un agente profiláctico o terapéutico (*por ejemplo*, un anticuerpo de la presente divulgación), o de una composición que se describe en el presente documento que será eficaz en la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT se puede determinar mediante técnicas clínicas convencionales.

Por consiguiente, una dosificación de un anticuerpo o una composición que da como resultado un título del suero de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 450 µg/ml, y en algunas realizaciones al menos 0,1 µg/ml, al menos 0,2 µg/ml, al menos 0,4 µg/ml, al menos 0,5 µg/ml, al menos 0,6 µg/ml, al menos 0,8 µg/ml, al menos 1 µg/ml, al

5 menos 1,5 µg/ml, y preferentemente al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 30 µg/ml, al menos 35 µg/ml, al menos 40 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 75 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 400 µg/ml, o al menos 450 µg/ml se puede administrar a un ser humano para la prevención, dirección, tratamiento y/o mejora de una enfermedad mediada por hLIGHT. Además, opcionalmente se pueden usar ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a usar en la formulación también dependerá de la vía de administración, y de la gravedad de una enfermedad mediada por hLIGHT, y se debería decidir de acuerdo con el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente.

10 Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas de respuesta a dosis derivadas de sistemas de ensayo en modelos *in vitro* o animales.

15 Para los anticuerpos de la presente divulgación, la dosificación administrada a un paciente por lo general es de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. En algunas realizaciones, la dosificación administrada al paciente es de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 75 mg/kg del peso corporal del paciente. Preferentemente, la dosificación administrada a un paciente está entre 1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del paciente, más preferentemente de 1 mg/kg a 5 mg/kg del peso corporal del paciente. Generalmente, los anticuerpos humanos tienen una vida media más larga dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de tres especies debido a la respuesta inmune a los polipéptidos extraños. Por lo tanto, a menudo son posibles dosificaciones más bajas de anticuerpos humanos y una administración menos frecuente. Además, la dosificación y la frecuencia de administración de los anticuerpos de la presente divulgación se pueden reducir aumentando la reabsorción y penetración en los tejidos de los anticuerpos mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

25 Aproximadamente 100 mg/kg o menos, aproximadamente 75 mg/kg o menos, aproximadamente 50 mg/kg o menos, aproximadamente 25 mg/kg o menos, aproximadamente 10 mg/kg o menos, aproximadamente 5 mg/kg o menos, aproximadamente 1 mg/kg o menos, aproximadamente 0,5 mg/kg o menos, o aproximadamente 0,1 mg/kg o menos de un anticuerpo de la presente divulgación se pueden administrar 5 veces, 4 veces, 3 veces, 2 veces o, preferentemente, 1 vez para tratar una enfermedad mediada por hLIGHT. Un anticuerpo de la presente divulgación se puede administrar aproximadamente 1-12 veces, en la que las dosis se pueden administrar si fuera necesario, *por ejemplo*, de forma semanal, quincenal, mensual, bimensual, trimensual, *etc.*, tal como lo determine un médico. Una dosis más baja (*por ejemplo*, 1-15 mg/kg) se puede administrar más frecuentemente (*por ejemplo*, 3-6 veces). Una dosis más alta (*por ejemplo*, 25-100 mg/kg) se puede administrar menos frecuentemente (*por ejemplo*, 1-3 veces). Sin embargo, tal como será evidente para los expertos en la materia, otras cantidades de dosificación y programaciones se pueden determinar fácilmente.

40 Aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg o menos, aproximadamente 50 mg/kg o menos, aproximadamente 25 mg/kg o menos, aproximadamente 10 mg/kg o menos, aproximadamente 5 mg/kg o menos, aproximadamente 1 mg/kg o menos, aproximadamente 0,5 mg/kg o menos, aproximadamente 0,1 mg/kg o menos de un anticuerpo de la presente divulgación en una formulación de liberación sostenida se pueden administrar a un sujeto, preferentemente un ser humano, para prevenir, dirigir, tratar y/o mejorar una enfermedad mediada por hLIGHT. Un bolo de aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg o menos, aproximadamente 50 mg/kg o menos, aproximadamente 25 mg/kg o menos, aproximadamente 10 mg/kg o menos, aproximadamente 5 mg/kg o menos, aproximadamente 1 mg/kg o menos, aproximadamente 0,5 mg/kg o menos, o aproximadamente 0,1 mg/kg o menos de un anticuerpo de la presente divulgación que no está en una formulación de liberación sostenida se puede administrar a un sujeto, preferentemente un ser humano, para prevenir, dirigir, tratar y/o mejorar una enfermedad mediada por hLIGHT, y después de un determinado periodo de tiempo, aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg o menos, aproximadamente 50 mg/kg o menos, aproximadamente 25 mg/kg o menos, aproximadamente 10 mg/kg o menos, aproximadamente 5 mg/kg o menos, aproximadamente 1 mg/kg o menos, aproximadamente 0,5 mg/kg o menos, o aproximadamente 0,1 mg/kg o menos de un anticuerpo de la presente divulgación en una liberación sostenida se administra a dicho sujeto (*por ejemplo*, por vía intranasal o por vía intramuscular) dos, tres o cuatro veces (preferentemente una vez). Un determinado periodo de tiempo puede ser de 1 a 5 días, una semana, dos semanas, o un mes.

55 Una dosis individual de un anticuerpo de la presente divulgación se puede administrar a un paciente para prevenir, dirigir, tratar y/o mejorar una enfermedad mediada por hLIGHT dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce veces, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuna, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco o veintiséis a intervalos quincenales (por ejemplo, aproximadamente 14 días) durante el transcurso del año, en la que la dosis se selecciona entre el grupo que consiste en aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, aproximadamente 95 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, o una combinación de las mismas (*es decir*, cada dosis mensual puede ser o no ser idéntica).

Una dosis individual single de un anticuerpo de la presente divulgación se puede administrar a un paciente para prevenir, dirigir, tratar y/o mejorar una enfermedad mediada por hLIGHT dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, o doce veces a aproximadamente intervalos mensuales (por ejemplo, aproximadamente 30 días) durante el transcurso de un año, en la que la dosis se selecciona entre el grupo que consiste en aproximadamente

5 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente

10 90 mg/kg, aproximadamente 95 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, o una combinación de las mismas (*es decir*, cada dosis mensual puede ser o no ser idéntica).

Una dosis individual de un anticuerpo de la presente divulgación se puede administrar a un paciente para prevenir, dirigir, tratar y/o mejorar una enfermedad mediada por hLIGHT dos, tres, cuatro, cinco, o seis veces a aproximadamente intervalos bimensuales (por ejemplo, aproximadamente 60 días) durante el transcurso de un año, en la que la dosis se selecciona entre el grupo que consiste en aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, aproximadamente 95 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, o una combinación de las mismas (*es decir*, cada dosis bimensual puede ser o no ser idéntica).

Una dosis individual de un anticuerpo de la presente divulgación se puede administrar a un paciente para prevenir, dirigir, tratar y/o mejorar una enfermedad mediada por hLIGHT dos, tres, o cuatro veces a aproximadamente intervalos trimensuales (*por ejemplo*, aproximadamente 120 días) durante el transcurso de un año, en la que la dosis se selecciona entre el grupo que consiste en aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 45 mg/kg, aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 55 mg/kg, aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 65 mg/kg, aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 85 mg/kg, aproximadamente 90 mg/kg, aproximadamente 95 mg/kg, aproximadamente 100 mg/kg, o una combinación de las mismas (*es decir*, cada dosis trimensual puede ser o no ser idéntica).

La vía de administración para una dosis de un anticuerpo de la presente divulgación a un paciente puede ser intranasal, intramuscular, intravenosa, o una combinación de las mismas, pero también son aceptables otras vías que se describen en el presente documento. Cada dosis puede se puede administrar o no administrar mediante una

40 vía de administración idéntica. Un anticuerpo de la presente divulgación se puede administrar a través de múltiples vías simultáneamente o posteriormente a otras dosis del mismo o diferente anticuerpo de la presente divulgación.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden administrar profilácticamente o terapéuticamente a un sujeto. Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden administrar profilácticamente o terapéuticamente a un sujeto para prevenir, disminuir o mejorar una enfermedad mediada por hLIGHT o síntoma de la misma.

45

Terapia genética

Los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican anticuerpos tal como se describe en el presente documento o derivados funcionales de los mismos, se administran para prevenir, dirigir, tratar y/o mejorar una enfermedad mediada por hLIGHT por medio de terapia genética. Terapia genética se refiere a terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. Los ácidos nucleicos pueden producir su anticuerpo codificado, y el anticuerpo media un efecto profiláctico o terapéutico.

55 Cualquiera de los métodos para terapia genética disponibles en la técnica se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación. Métodos a modo de ejemplo se describen a continuación.

Para una revisión general de los métodos de terapia genética, véase Goldspiel y col., 1993, *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3: 87- 95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260: 926-932; y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; Mayo de 1993, *TIBTECH* 11 (5): 155-215. Métodos usados habitualmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden usar se describen en Ausubel y col. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990).

60

65 Preferentemente, una composición de la presente divulgación comprende ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la presente divulgación, siendo parte dichos ácidos nucleicos de un vector de expresión que expresa

el anticuerpo o proteínas quiméricas o cadenas pesadas o ligeras de las mismas en un huésped adecuado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente promotores heterólogos, unidos operativamente a la región que codifica el anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y, opcionalmente, específico de tejidos. En otra realización particular, se usan moléculas de ácidos nucleicos en las que las secuencias que codifican anticuerpos y cualquier otra secuencia deseada están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de este modo de expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos (Koller y Smities, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra y col., 1989, Nature 342: 435-438). La molécula de anticuerpo expresada puede ser una única cadena de anticuerpo; como alternativa, las secuencias de ácidos nucleicos pueden incluir secuencias que codifican las cadenas tanto pesadas como ligeras, o fragmentos de las mismas, del anticuerpo.

La administración de ácidos nucleicos en un sujeto puede ser directa, en cuyo caso sujeto está expuesto directamente al ácido nucleico o a vectores que transportan ácidos nucleicos, o indirecta, en cuyo caso, las células primero se transforman con los ácidos nucleicos *in vitro*, y a continuación se trasplantan en el sujeto. Estos dos procedimientos de estudio son conocidos, respectivamente, como terapia genética *in vivo* o *ex vivo*.

Las secuencias de ácidos nucleicos se pueden administrar directamente *in vivo*, en los que las secuencias se expresan para producir el producto codificado. Esto se puede realizar mediante numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante su construcción como parte de un vector apropiado de expresión de ácidos nucleicos y administrando el vector de modo que las secuencias se conviertan en intracelulares, *por ejemplo*, por infección usando retroviral les defectuosos o atenuados u otros vectores virales (véase la Patente de Estados Unidos N° 4.980.286), o por inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (*por ejemplo*, una pistola genética; Biolistic, Dupont), o revestimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o administrando los en unión a un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrando lo en unión con un sujeto ligando a endocitosis mediada por receptores (véase, *por ejemplo*, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432) (que se pueden usar para dirigirse a tipos celulares que expresan específicamente los receptores), *etc.* Se pueden formar complejos de ácido-ligando en los que ligando comprende un péptido viral fusogénico para alterar endosomas, permitiendo que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. El ácido nucleico se puede dirigir *in vivo* para la absorción específica y expresión, mediante dirección a un receptor específico (véanse, *por ejemplo*, las Publicaciones de PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; W093/14188, WO 93/20221). Como alternativa, el ácido nucleico se puede introducir por vía intracelular e incorporar dentro del ADN de la célula huésped para la expresión, por recombinación homóloga (Koller y Smities, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932- 8935; y Zijlstra y col., 1989, Nature 342: 435-438).

Se pueden usar vectores virales que contienen secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la presente divulgación. Por ejemplo, se puede usar un vector retroviral (véase Miller y col., 1993, Meth. Enzymol. 217: 581-599). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetamiento del genoma viral y la integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo a usar en la terapia genética se pueden clonar en uno o más vectores, lo que facilita la administración del gen en un sujeto. Más detalles acerca de vectores retrovirales se pueden encontrar en Boesen y col., 1994, Biotherapy 6: 291-302, que describe el uso de un vector retroviral para administrar el gen *mdr 1* a células madre hematopoyéticas con el fin de hacer a las células madre más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia genética son: Clowes y col., 1994, J. Clin. Invest. 93: 644-651; Klein y col., 1994, Blood 83: 1467-1473; Salmons y Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4: 129-141; y Grossman y Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3: 110-114.

Los adenovirus son otros vectores virales que se pueden usar en terapia genética. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para la administración de genes a los epitelios de las vías respiratorias. Los adenovirus infectan naturalmente epitelios respiratorios en los que causan una enfermedad leve. Otras dianas para los sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales, y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se dividen. Kozarsky y Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3: 499-503 presenta una revisión de terapia genética a base de adenovirus. Bout y col., 1994, Human Gene Therapy 5: 3-10 demostró el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Otros ejemplos del uso de adenovirus en terapia genética se pueden encontrar en Rosenfeld y col., 1991, Science 252: 431-434; Rosenfeld y col., 1992, Cell 68: 143-155; Mastrangeli y col., 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; Publicación de PCT W094/12649; y Wang y col., 1995, Gene Therapy 2: 775-783. En una realización preferente, se usan vectores de adenovirus.

Además, el virus asociado a adeno (AAV) se ha propuesto para uso en terapia genética (Walsh y col., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289- 300; y Patente de Estados Unidos N° 5.436.146).

Otro enfoque de la terapia genética implica la transferencia de un gen a células en cultivo tisular mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio, o infección vírica. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células se colocan a continuación bajo selección para aislar las células que se han tomado y que expresan el gen transferido.

Esas células a continuación se administran a un sujeto.

El ácido nucleico se puede introducir en una célula antes de administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. Dicha introducción se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia genética mediada por cromosomas, transferencia genética mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, *etc.* En la técnica son conocidas numerosas técnicas para la introducción de genes extraños en las células (véase, *por ejemplo*, Loeffler y Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217: 599-618; Cohen y col., 1993, Meth. Enzymol. 217: 618-644; Clin. Pharma. Ther. 29:69-92 (1985)) y se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación, con la condición de que el desarrollo y las funciones fisiológicas necesarios de las células receptoras no se interrumpan. La técnica debería proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico se pueda expresar por la célula y preferentemente se pueda heredar y expresar por su progenie celular.

Las células recombinantes resultantes se pueden administrar a un sujeto mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Las células sanguíneas recombinantes (*por ejemplo*, células madre hematopoyéticas o progenitoras) se administran preferentemente por vía intravenosa. La cantidad de células previstas para el uso depende del efecto deseado, estado del paciente, *etc.*, y la puede determinar un experto en la materia.

Las células en las que un ácido nucleico se puede introducir con fines de terapia genética incluye cualquier tipo de célula disponible, deseada, e incluyen pero no se limitan a células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos, células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre hematopoyéticas o progenitoras, *por ejemplo*, tal como las que se obtienen a partir de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, *etc.*

La célula usada para la terapia genética puede ser autóloga al sujeto.

Si se usan células recombinantes en terapia genética, secuencias de ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo de la presente divulgación se pueden introducir en las células de tal manera que son expresables por las células o su progenie, y las células recombinantes se administran a continuación *in vivo* para el efecto terapéutico. Se pueden usar células madre o progenitoras. Cualquier célula madre y/o progenitora que se pueda aislar y mantener *in vitro* se puede usar potencialmente de acuerdo con esta realización de la presente divulgación (véase *por ejemplo*, la Publicación de PCT WO 94/08598; Stemple y Anderson, 1992, Cell 7 1: 973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; y Pittelkow y Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771).

El ácido nucleico a introducir para los fines de la terapia genética puede comprender un promotor inducible vinculado operativamente a la región de codificación, de tal modo que la expresión del ácido nucleico es controlable mediante el control de la presencia o ausencia del inductor apropiado de la transcripción.

Uso diagnóstico de anticuerpos

Los anticuerpos marcados de la presente divulgación y derivados y análogos de los mismos, que se unen de forma inmunespecífica un antígeno de hLIGHT se pueden usar con fines diagnósticos para detectar, diagnosticar, o controlar una enfermedad mediada por hLIGHT. La presente divulgación proporciona métodos para la detección de una enfermedad mediada por hLIGHT que comprende: (a) someter a ensayo la expresión de un antígeno de hLIGHT en células o una muestra de tejido de un sujeto usando uno o más anticuerpos de la presente divulgación que se unen de forma inmunespecífica al antígeno de hLIGHT; y (b) comparar el nivel del antígeno de hLIGHT con un nivel de control, *por ejemplo*, niveles en muestras tisulares normales (*por ejemplo*, a partir de un paciente que no padece una enfermedad mediada por hLIGHT, o a partir del mismo paciente antes del inicio de la enfermedad), por lo que un aumento en el nivel sometido ensayo del antígeno de hLIGHT en comparación con el nivel de control del antígeno de hLIGHT es indicativo de una enfermedad mediada por hLIGHT.

La presente divulgación proporciona un ensayo diagnóstico para diagnosticar una enfermedad mediada por hLIGHT que comprende: (a) someter a ensayo el nivel de un antígeno de hLIGHT en células o una muestra de tejido de un individuo usando uno o más anticuerpos de la presente divulgación que se unen de forma inmunespecífica a un antígeno de hLIGHT; y (b) comparar el nivel del antígeno de hLIGHT con un nivel de control, *por ejemplo*, los niveles en las muestras de tejido normal, por lo cual un aumento en el nivel de antígeno de hLIGHT sometido a ensayo en comparación con el nivel de control de antígeno de hLIGHT es indicativo de una enfermedad mediada por hLIGHT. Un diagnóstico más definitivo de una enfermedad mediada por hLIGHT puede permitir a los profesionales sanitarios usar medidas preventivas o tratamiento agresivo evitando de este modo el desarrollo más temprano por la progresión adicional de la enfermedad mediada por hLIGHT.

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden usar para someter a ensayo los niveles de antígeno de hLIGHT en una muestra biológica usando métodos inmunohistológicos clásicos tal como se describe en el presente documento o como lo conocen los expertos en la materia (*por ejemplo*, véase Jalcanon y col., 1985, J. Cell. Biol.

101: 976-985; y Jalcanon y col., 1987, J. Cell. Biol. 105: 3087-3096). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión genética de proteínas incluyen inmunoensayos tales como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Los niveles adecuados de ensayo de anticuerpo se conocen en la técnica e incluyen marcas enzimáticas, tales como, glucosa oxidasa; radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{121}In), y tecnecio (^{99}Tc); marcas luminescentes, tales como luminol; y marcas fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Un aspecto de la presente divulgación es la detección y diagnóstico de una enfermedad mediada por hLIGHT en un ser humano. El diagnóstico puede comprender: a) administrar (por ejemplo, por vía parenteral, por vía subcutánea, o por vía intraperitoneal) a un sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo marcado que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT; b) esperar durante un intervalo de tiempo después de la administración para permitir que el anticuerpo marcado se concentre preferentemente en sitios en el sujeto en los que el antígeno de hLIGHT se expresa (y para que la molécula marcada no unida se aclare al nivel de fondo); c) determinar el nivel de fondo; y d) el anticuerpo marcado en el sujeto, de tal manera que la detección de anticuerpo marcado por encima del nivel de fondo indica que el sujeto tiene una enfermedad mediada por hLIGHT. El nivel de fondo se puede determinar mediante diversos métodos que incluyen, comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor convencional determinado previamente para un sistema en particular.

En la técnica se entenderá que el tamaño del sujeto y el sistema de formación de imágenes usado determinarán la cantidad de resto de formación de imágenes necesario para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un resto de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radiactividad inyectada variará normalmente de aproximadamente 5 to 20 milicuries de ^{99}Tc . El anticuerpo marcado a continuación se marcará preferentemente en la ubicación de las células que contienen la proteína específica. La formación de imágenes tumorales *in vivo* se describe en S.W. Burchiel y col., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

Dependiendo de varias variables, que incluyen el tipo de marca usada y el modo de administración, el intervalo de tiempo después de la administración para permitir que el anticuerpo marcado se concentre preferentemente en sitios en el sujeto y que el anticuerpo no marcado se aclare a nivel de fondo es de 6 a 48 horas o de 6 a 24 horas o de 6 a 12 horas. El intervalo de tiempo después de la administración puede ser de 5 a 20 días o de 5 a 10 días.

El control de una enfermedad mediada por hLIGHT se puede realizar repitiendo el método para el diagnóstico de una enfermedad mediada por hLIGHT, por ejemplo, un mes después del diagnóstico inicial, seis meses después del diagnóstico inicial, un año después del diagnóstico inicial, etc.

La presencia de la molécula marcada se puede detectar en el sujeto usando métodos conocidos en la técnica de barrido *in vivo*. Estos métodos dependen del tipo de marca usada. Los expertos en la materia serán capaces de determinar el método apropiado para detectar una marca en particular. Los métodos y dispositivos que se pueden usar en los métodos de diagnóstico de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, tomografía computerizada (CT), exploración de todo el cuerpo, tal como tomografía por emisión de positrones (PET), formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), y ecografía.

La molécula se puede marcar con un radioisótopo y se detecta en el paciente usando un instrumento quirúrgico sensible a la radiación (Thurston y col., Patente de Estados Unidos N° 5.441.050). La molécula se puede marcar con un compuesto fluorescente y se detecta en el paciente usando un instrumento de barrido sensible a la fluorescencia. La molécula se puede marcar con un metal emisor de positrones y se detecta en el paciente usando tomografía por emisión de positrones. La molécula se puede marcar con un marcador paramagnético y se puede detectar en un paciente usando formación de imágenes por resonancia magnética (MRI).

Métodos para producir anticuerpos

Los anticuerpos de la presente divulgación que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno se pueden producir mediante un método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o preferentemente, por técnicas de expresión recombinante. La práctica de la presente divulgación usa, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, análisis genético, ADN recombinante, química orgánica, bioquímica, PCR, síntesis y modificación de oligonucleótidos, hibridación de ácido nucleico, y campos relacionados dentro de la habilidad en la materia. Estas técnicas se describen en las referencias que se citan en el presente documento y se explican detalladamente en la bibliografía. Véase, *por ejemplo*, Maniatis y col. (1982) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook y col. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook y col. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales); Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987 y actualizaciones anuales) Gait (ed.) (1984) Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press; Birren y col. (eds.) (1999) Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold

Spring Harbor Laboratory Press.

5 Anticuerpos policlonales que se unen de forma inespecífica a un antígeno se pueden producir mediante diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un antígeno humano se puede administrar a diversos animales huéspedes que incluyen, pero no se limitan a, conejos, ratones, ratas, *etc.* para inducir la producción de sueros que se contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno humano. Diversos adyuvantes se pueden usar para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies huésped, e incluyen, pero no se limitan a, solución de Freund (completa e incompleta), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activa tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones oleosas, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes además son bien conocidos en la técnica.

15 Anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando una gran diversidad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen el uso de tecnologías de hibridomas, recombinante, y de visualización de fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma que incluyen las conocidas en la técnica y que se enseñan, por ejemplo, en Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 681 (Elsevier, N.Y., 1981). El término "anticuerpo monoclonal" tal como se usa en el presente documento no se limita a anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridomas. Otros métodos a modo de ejemplos para producir anticuerpos monoclonales se analizan en cualquier parte en el presente documento, tal como *por ejemplo*, el uso del KM mouse™. Métodos adicionales a modo de ejemplo para producir anticuerpos monoclonales se proporcionan en los Ejemplos en el presente documento.

25 Métodos para producir e identificar sistemáticamente anticuerpos específicos usando tecnología de hibridomas son rutinarios y bien conocidos en la técnica. En resumen, ratones se pueden inmunizar con un antígeno de hLIGHT y una vez que se detecta una respuesta inmune, *por ejemplo*, anticuerpos específicos para el antígeno de hLIGHT se detectan en el suero de ratón, el bazo del ratón se cosecha y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan a continuación mediante técnicas bien conocidas para cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponible en la ATCC. Los hibridomas se seleccionan y se clonan por dilución limitada.

35 Además, se puede usar una técnica RIMMS (sitios múltiples de inmunización repetitiva) para inmunizar a un animal (Kilpatrick y col., 1997 *Hybridoma* 16: 381-9). Los clones de hibridomas se someten a ensayo a continuación mediante métodos conocidos en la técnica para las células que segregan anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido de la presente divulgación. El líquido ascítico, que contiene generalmente altos niveles de anticuerpos, se puede generar por inmunización de ratones con clones de hibridoma positivos.

40 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos para generar anticuerpos mediante el cultivo de una célula de hibridoma segregando un anticuerpo modificado de la presente divulgación en los que, preferentemente, el hibridoma se genera por fusión de esplenocitos aislados a partir de un ratón inmunizado con un antígeno de hLIGHT con células de mieloma y a continuación identificando sistemáticamente los hibridomas dando como resultado la fusión de clones de hibridomas que segregan un anticuerpo capaz de unirse a un antígeno de hLIGHT.

45 Fragmentos de anticuerpos que reconocen antígenos específicos de hLIGHT se pueden generar mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, fragmentos de Fab y $F(ab')_2$ de la presente divulgación se pueden producir por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos de Fab) o pepsina (para producir fragmentos de $F(ab')_2$). Los fragmentos contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. Además, los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden generar usando diversos métodos de visualización de fagos conocidos en la técnica.

55 Por ejemplo, también se pueden generar anticuerpos usando diversos métodos de visualización de fagos. En los métodos de visualización de fagos, se visualizan dominios de anticuerpos funcionales sobre la superficie de partículas de fagos que transportan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios de VH y VL se amplifican a partir de bibliotecas de ADNc animal (*por ejemplo*, bibliotecas de ADNc humano o de murino de tejidos afectados). El ADN que codifica los dominios de VH y VL se reconvinó en conjunto con un enlazador scFv por PCR y se clona en un vector fagémido. El vector se electropora en *E. coli* y la *E. coli* se infecta con un vector auxiliar. Los fagos usados en estos métodos por lo general son fagos filamentosos que incluyen fd y M13 y los dominios de VH y VL normalmente se condensan de forma recombinante con el gen III del fago o con el gen VIII. Los fagos que expresan un dominio de unión a antígenos que se une a un antígeno en particular se pueden seleccionar o identificar con antígenos, *por ejemplo*, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado hasta una superficie o perla sólida. Ejemplos de métodos de visualización de fagos que se pueden usar para preparar los anticuerpos de la presente divulgación incluyen los que se desvelan en Brinkman y col., 1995, *J. Immunol. Methods* 182: 41-50; Ames y col., 1995, *J. Immunol. Methods* 184: 177-186; Kettleborough y col., 1994, *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958; Persic y col., 1997, *Gene* 187: 9-18; Burton y col., 1994, *Advances in*

Immunology 57: 191-280; Solicitud de PCT N° PCT/GB91/O1 134; Publicaciones Internacionales N° WO 90/02809, N° WO 91/10737, N° WO 92/01047, N° WO 92/18619, N° WO 93/1 1236, N° WO 95/15982, N° WO 95/20401, y N° WO 97/13844; y Patentes de Estados Unidos N° 5.698.426, N° 5.223.409, N° 5.403.484, N° 5.580.717, N° 5.427.908, N° 5.750.753, N° 5.821.047, N° 5.571.698, N° 5.427.908, N° 5.516.637, N° 5.780.225, N° 5.658.727, N° 5.733.743 y N° 5.969.108.

Tal como se ha descrito en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones que codifican anticuerpos a partir del fago se pueden aislar y usar para generar anticuerpos enteros, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígenos deseado, y expresar en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insectos, células vegetales, levadura, y bacterias, *por ejemplo*, tal como se describe a continuación. Además se pueden usar técnicas para producir de forma recombinante fragmentos de Fab, Fab' y F (ab')₂ usando métodos conocidos en la técnica tales como los que se desvelan en la publicación de PCT N° WO 92/22324; Mullinax y col., 1992, BioTechniques 12 (6) : 864- 869; Sawai y col., 1995, AJRI 34: 26-34; y Better y col., 1988, Science 240: 1041-1043.

Para generar anticuerpos enteros, cebadores de PCR que incluyen secuencias de nucleótidos de VH o VL, un sitio de restricción, y una secuencia de flanqueo para proteger el sitio de restricción se pueden usar para amplificar las secuencias de VH o VL en clones de scFv. Usando técnicas de clonación conocidas por los expertos en la materia, los dominios de VH amplificados por PCR se pueden clonar en vectores que expresan una región constante de VH, *por ejemplo*, la región constante gamma 4 humana, y los dominios de VL amplificados por PCR se pueden clonar en vectores que expresan una región constante de VL, *por ejemplo*, las regiones constantes kappa o lambda humanas. Los dominios del VH y VL también se pueden clonar en un vector que expresan las regiones constantes necesarias. Los vectores de conversión de cadena pesada y los vectores de conversión de cadena ligera a continuación se cotransfectan en líneas celulares para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan anticuerpos de longitud total, *por ejemplo*, IgG, usando técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Para algunos usos, que incluyen el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferente usar anticuerpos humanos o quiméricos. Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Se pueden preparar anticuerpos humanos mediante diversos métodos conocidos en la técnica que incluyen los métodos de presentación de fagos que se han descrito anteriormente usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse además las Patentes de Estados Unidos N° 4.444.887 y N° 4.716.111; y las Publicaciones Internacionales N° WO 98/46645, N° WO 98/50433, N° WO 98/24893, N° WO 98/16654, N° WO 96/34096, N° WO 96/33735, y N° WO 91/10741.

Preferentemente, se producen anticuerpos humanos. Se pueden producir anticuerpos humanos y/o anticuerpos totalmente humanos usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo los Ejemplos que se proporcionan en el presente documento. Por ejemplo, ratones transgénicos que son incapaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos genéticos de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera se pueden introducir aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable humana, región constante, y región de diversidad se pueden introducir en células madre embrionarias de ratón además de los genes de cadena pesada y ligera. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera se pueden convertir en no funcionales separadamente o simultáneamente con la introducción de locus de inmunoglobulina mediante recombinación homóloga. En particular, la supresión homocigótica de la región J_H previene la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos a continuación se crían para producir descendencia homocigótica que expresan anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos inmunizan de la forma habitual con un antígeno seleccionado, *por ejemplo*, toda o una parte de un polipéptido de la presente divulgación. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno a partir de ratones transgénicos, inmunizados usando tecnología convencional de hibridomas. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados en los ratones transgénicos se reordena durante la diferenciación de linfocitos B, y posteriormente se someten a intercambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, usando dicha técnica, es posible producir terapéuticamente anticuerpos IgG, IgA, IgM y IgE útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93). Para un análisis detallado de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse, *por ejemplo*, las publicaciones de PCT N° WO 98/24893, N° WO 96/34096, y N° WO 96/33735; y las Patentes de Estados Unidos N° 5.413.923, N° 5.625.126, N° 5.633.425, N° 5.569.825, N° 5.661.016, N° 5.545.806, N° 5.814.318, y N° 5.939.598. Otros métodos se detallan en los Ejemplos en el presente documento. Además, compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San Jose, CA) se pueden comprometer a proporcionar anticuerpos humanos dirigidos frente a antígenos seleccionados usando tecnología similar a la que se ha descrito anteriormente.

Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo se derivan de moléculas diferentes de inmunoglobulina. En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véase, *por ejemplo*, Morrison, 1985, Science 229: 1202; Oi y col., 1986, BioTechniques 4: 214; Gillies y col., 1989, J. Immunol. Methods 125: 191-202; y las Patentes de Estados Unidos N° 5.807.715, N° 4.816.567, N° 4.816.397, y N° 6.331.415.

Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo o su variante o fragmento del mismo que es capaz de unirse a un antígeno predeterminado y que comprende una región marco que tiene básicamente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana y una CDR que tiene básicamente la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina no humana. Un anticuerpo humanizado comprende básicamente todos de al menos uno, y por lo general dos, dominios variable (Fab, Fab', F (ab')₂, Fabc, Fv) en el que todas o básicamente todas las regiones de CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana (*es decir*, anticuerpo dador) y todas o básicamente todas las regiones marco son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. Preferentemente, un anticuerpo humanizado también comprende al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), por lo general la de una inmunoglobulina humana. Habitualmente, el anticuerpo contendrá tanto la cadena ligera como al menos el dominio variable de una cadena pesada. El anticuerpo también puede incluir las regiones CH1, bisagra, CH2, CH3, y CH4 de la cadena pesada. El anticuerpo humanizado se puede seleccionar entre cualquier clase de inmunoglobulinas, que incluye IgM, IgG, IgD, IgA e IgE, y cualquier isotipo, que incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Habitualmente, el dominio constante es un dominio constante de fijación a complementos en el que se desea que el anticuerpo humanizado presente actividad citotóxica, y la clase por lo general es IgG1. Cuando dicha actividad citotóxica no es deseable, el dominio constante puede ser de la clase IgG2. Ejemplos de dominios constantes de VL y VH que se pueden usar en la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, C-kappa y C-gamma-1 (nGlm) que se describen en Johnson y col. (1997) J. Infect. Dis. 176, 1215- 1224 y los que se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.824.307. El anticuerpo humanizado puede comprender secuencias de más de la clase de isotipo, y la selección de dominios constantes en particular para optimizar funciones efectoras deseadas está dentro de la experiencia habitual en la materia. Las regiones marco y CDR de un anticuerpo humanizado no necesitan corresponder precisamente con las secuencias precursoras, *por ejemplo*, la CDR dadora o el marco consenso se pueden mutagenizar por sustitución, inserción o supresión de al menos un resto de modo que el resto de CDR o marco en el sitio no corresponde con el anticuerpo de consenso o importado. Dichas mutaciones, sin embargo, no serán extensas. Por lo general, al menos un 75 % de los restos de anticuerpo humanizado corresponderán con los de las secuencias FR y CDR precursor, más a menudo un 90 %, y más preferentemente mayor que un 95 %. Se puede producir anticuerpos humanizados usando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, injerto de CDR (Patente Europea N° EP 239.400; Publicación internacional N° WO 91/09967; y Patentes de Estados Unidos N° 5.225.539, N° 5.530.101, y N° 5.585.089), revestimiento o cambio de la superficie (Patente Europea N° EP 592.106 y N° EP 519.596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28 (4/5) : 489-498; Studnicka y col., 1994, Protein Engineering 7 (6) : 805- 814; y Roguska y col., 1994, PNAS 91: 969- 973), mezcla aleatoria de cadenas (Patente de Estados Unidos N° 5.565.332), y técnicas desveladas, *por ejemplo*, en Patente de Estados Unidos N° 6.407.213, Patente de Estados Unidos N° 5.766.886, documento WO 9317105, Tan y col., J. Immunol. 169: 1119 25 (2002), Caldas y col., Protein Eng. 13 (5) : 353-60 (2000), Morea y col., Methods 20 (3) : 267 79 (2000), Baca y col., J. Biol. Chem. 272 (16) : 10678-84 (1997), Roguska y col., Protein Eng. 9 (10) : 895 904 (1996), Couto y col., Cancer Res. 55 (23 Supp) : 5973s-5977s (1995), Couto y col., Cancer Res. 55 (8) : 1717-22 (1995), Sandhu JS, Gene 150 (2) : 409- 10 (1994), y Pedersen y col., J. Mol. Biol. 235 (3) : 959-73 (1994). Véase también la Pub. de Patente de Estados Unidos N° US 2005/0042664 A1 (24 de Feb. de 2005). A menudo, restos marco en las regiones marco serán sustituidos con el resto correspondiente a partir del anticuerpo dador de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión a antígenos. Estas sustituciones marco se identifican mediante métodos bien conocidos en la técnica, *por ejemplo*, por modelado de las interacciones de los restos de CDR y marco para identificar restos marco importantes para la unión a antígenos y comparación de secuencia hasta identificar restos marco inusuales en posiciones en particular. (Véase, *por ejemplo*, Queen y col., Patente de Estados Unidos N° 5.585.089; y Reichmann y col., 1988, Nature 332: 323).

Anticuerpos de un solo dominio, por ejemplo, anticuerpos que carecen de cadenas ligeras, se puede producir mediante métodos bien conocidos en la técnica. Véase Riechmann y col., 1999, J. Immunol. 231: 25-38; Nuttall y col., 2000, Curr. Pharm. Biotechnol. 1 (3) : 253-263; Muylderman, 2001, J. Biotechnol. 74 (4) : 277302; Patente de Estados Unidos N° 6.005.079; y Publicación Internacional N° WO 94/04678, N° WO 94/25591, y N° WO 01/44301.

Además, los anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT, a su vez, se pueden usar para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imitan" un antígeno usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. (Véase, *por ejemplo*, Greenspan & Bona, 1989, FASEB J. 7 (5) : 437- 444; y Nissinoff, 1991, J. Immunol. 147 (8) : 2429- 2438).

55 Polinucleótidos que codifican un anticuerpo

La presente divulgación proporciona polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican un anticuerpo de la presente divulgación que se une de forma inmuno-específica a un epítipo de hLIGHT. La presente divulgación también incluye polinucleótidos que se hibridan en condiciones de hibridación muy rigurosas, intermedias o menos rigurosas, *por ejemplo*, tal como se ha definido *anteriormente*, a polinucleótidos que codifican un anticuerpo modificado de la presente divulgación.

Los polinucleótidos se pueden obtener, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos se puede determinar, depende cualquier método conocido en la técnica. Dado que las secuencias de aminoácidos de E1, E13, E63, F19 y F23 son conocidas (véase, *por ejemplo*, SEC ID N°: 41, 42, 43, 44, 45, 102, 46, 103, 47, 48, 104, 49, 105, 106, y 50; y N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (, respectivamente), las

secuencias de nucleótidos que codifican estos anticuerpos y versiones modificadas de estos anticuerpos se pueden determinar usando métodos bien conocidos en la técnica, es decir, codones de nucleótidos conocidos por codificar aminoácidos en particular se ensamblan de tal manera que generan un ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Dicho polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede ensamblar a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (*por ejemplo*, tal como se describe en Kutmeier y col., 1994, BioTechniques 17:242), que, en resumen, implica la síntesis de oligonucleótidos de solapamiento que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, fragmentos, o variantes del mismo, homogeneización y ligado de esos oligonucleótidos, y a continuación amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

10 Como alternativa, un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente divulgación se puede generar a partir de un ácido nucleico a partir una fuente adecuada (*por ejemplo*, un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7729, PTA-7842, PTA-7818, PTA-7819, o PTA-7728 de la ATTC (E1, E13, E63, F19 o F23). Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo en particular no está disponible, pero la secuencia de la molécula de anticuerpo se conoce, un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina se puede sintetizar químicamente
15 obtener a partir de una fuente adecuada (*por ejemplo*, una biblioteca de ADNc de anticuerpos o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferentemente poli A+ ARN, aislado a partir de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la presente divulgación) por amplificación de PCR usando cebadores sintéticos que se pueden hibridar en los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia genética en particular para identificar, *por ejemplo*, un clon de ADNc a partir una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Los ácidos nucleicos amplificados generados por PCR se pueden clonar a continuación en vectores de clonación replicables usando cualquier método bien conocido en la técnica.

25 Las moléculas de ácido nucleico de la presente divulgación pueden comprender o consisten en una secuencia de ácidos nucleicos tal como se describe en una cualquiera de las SEC ID N°: 41, 42, 43, 44, 45 (que codifican una VH) y/o SEC ID N°: 102, 46, 103, 47, 48, 104, 49, 105, 106, o 50 (que codifican un VL), o combinación de los mismos (*por ejemplo*, tal como una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de la presente divulgación, tal como un anticuerpo de longitud total, cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo, o un anticuerpo de una sola cadena de la presente divulgación).

30 Expresión recombinante de un anticuerpo

La expresión recombinante de un anticuerpo de la presente divulgación (*por ejemplo*, un anticuerpo de cadena total, cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo, o un anticuerpo de una sola cadena de la presente divulgación) que se une de forma inmuno-específica a un antígeno de hLIGHT requiere la construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo, cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o fragmento del mismo (preferentemente, pero no necesariamente, que contiene la cadena pesada y/o ligera dominio variable) de la presente divulgación, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo se puede producir mediante tecnología de ADN recombinante
40 usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por lo tanto, en el presente documento se describen métodos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifican anticuerpos. Se pueden usar métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican anticuerpos y señales apropiadas de control de transcripción y de traslación. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. La presente divulgación, por lo tanto, proporciona vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo tal como se describe en el presente documento, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, una cadena pesada o ligera dominio variable de un anticuerpo o un fragmento del mismo, o una cadena pesada o ligera CDR, unidad de forma operativa a un promotor. Dichos vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifican la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, *por ejemplo*, Publicación Internacional N° WO 86/05807 y N° WO 89/01036; y la Patente de Estados Unidos N° 5.122.464) y el dominio variable del anticuerpo se puede clonar en dicho vector para la expresión de toda la cadena pesada, toda la cadena ligera, o tanto cadenas pesadas como ligeras.

55 El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan a continuación mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la presente divulgación. Por lo tanto, la presente divulgación incluye células huésped que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo tal como se describe en el presente documento o fragmentos del mismo, o una cadena pesada o ligera del mismo, o fragmento del mismo, o un anticuerpo de una sola cadena tal como se describe en el presente documento, unido de forma operativa a un promotor heterólogo. Para la expresión de anticuerpos de doble
60 cadena, vectores que codifican tanto cadenas pesadas como ligeras se pueden coexpresar en la célula huésped para la expresión de toda la molécula de inmunoglobulina, tal como se detalla a continuación.

Diversos sistemas de vectores de expresión del huésped se pueden usar para expresar las moléculas de anticuerpo de la presente divulgación (véase, *por ejemplo*, la Patente de Estados Unidos N° 5.807.715). Dichos sistemas
65 expresión del huésped representan vehículos mediante los cuales se pueden producir las secuencias de codificación de interés y posteriormente purificar, pero también representan células que, cuando se transforman o transfectan

con las secuencias apropiadas que codifican nucleótidos, pueden expresar una molécula de anticuerpo de la presente divulgación *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (*por ejemplo*, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen secuencias que codifican de anticuerpos; levadura (*por ejemplo*, *Saccharomyces Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias que codifican anticuerpos; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (*por ejemplo*, baculovirus) que contienen secuencias que codifican anticuerpos; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (*por ejemplo*, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus el mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (*por ejemplo*, plásmido Ti) que contienen secuencias que codifican anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (*por ejemplo*, células COS, CHO, BHK, 293, NS0, y 3T3) que albergan constructos de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (*por ejemplo*, promotor de la metalotioneína) o de virus de mamífero (*por ejemplo*, el promotor tardío de adenovirus; el promotor del virus 7,5K de vaccinia). Preferentemente, células bacterianas tales como *Escherichia coli*, y más preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de toda la molécula de anticuerpo recombinante, se usan para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, células de mamífero tales como células de ovario de hámster Chino (CHO), en conjunto con un vector tal como el elemento principal del promotor del gen intermedio temprano a partir de citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking y col., 1986, Gene 45: 101; y Cockett y col., 1990, Bio/Technology 8: 2). Preferentemente, los anticuerpos de la presente divulgación se producen en células CHO. La expresión de secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos de la presente divulgación que se unen de forma inmunoespecífica a un antígeno de hLIGHT se puede regular mediante un promotor constitutivo, promotor inducible o promotor específico de tejido.

En sistemas bacterianos, se puede seleccionar ventajosamente un número de vectores de expresión dependiendo del uso previsto para la molécula de anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicho anticuerpo, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, el vector pUR278 de expresión de *E. coli* (Ruther y col., 1983, EMBO 12:1791), en los que la secuencia que codifica el anticuerpo puede estar ligada individualmente al vector en marco con la región que codifica lac Z de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509); y similares. También se pueden usar vectores pGEX para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión 5-transferasa (GST). En general, dichas proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante la absorción y unión a perlas matriz de glutatión agarosa seguido de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores de pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de trombina o de proteasa del factor Xa de modo que el producto genético diana clonado se puede liberar a partir del resto de GST.

En un sistema de insecto, el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica anticuerpos se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (*por ejemplo* el gen de polihedrina) del virus y colocar bajo el control de un promotor de AcNPV (*por ejemplo* el promotor de polihedrina).

En células huésped de mamífero, se pueden usar un número de sistemas de expresión basados en virus. En casos en los que se usa un adenovirus como un vector de expresión, la secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede estar ligada a un complejo para el control de transcripción/traslación de adenovirus, *por ejemplo*, el promotor tardío y la secuencia directora tripartita. Este gen quimérico se puede insertar a continuación en el genoma del adenovirus por recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (*por ejemplo*, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en huéspedes infectados (*por ejemplo*, véase Logan y Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 355-359). También se pueden necesitar señales específicas de iniciación para la traducción eficaz de secuencias para la codificación del anticuerpo insertado. Estas señales incluyen el codón de iniciación de ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción de todo el inserto. Estas señales para el control de la traducción exógena y codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión se puede potenciar mediante la inclusión de elementos apropiados potenciadores de la transcripción, elementos de terminación de la transcripción, etc. (véase, *por ejemplo*, Bittner y col., 1987, Methods in Enzymol. 153: 51-544).

Además, se puede elegir una cepa de célula de huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto genético de la manera específica deseada. Dichas modificaciones (*por ejemplo*, glicosilación) y procesamiento (*por ejemplo*, escisión) de productos proteicos puede ser importante para la función de la proteína. Diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación después de la traducción de proteínas y productos genéticos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas huésped apropiados para asegurar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Para este fin, se pueden usar células huésped eucariotas que posean la maquinaria celular para el

procesamiento adecuado del transcrito primario, glicosilación, y fosforilación del producto genético. Dichas células huésped mamífero incluyen, pero no se limitan a, células CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT2O y T47D, NS0 (una línea celular de mieloma de murino que no produce ninguna cadena de inmunoglobulina de forma endógena), CRL7O3O y HsS78Bst. Preferentemente, los anticuerpos anti-hLIGHT monoclonales, totalmente humanos de la presente divulgación se producen en células de mamífero, tales como células CHO.

Para la producción de proteínas recombinantes con alto rendimiento, a largo plazo, es preferente la expresión estable. Por ejemplo, líneas celulares que expresan de forma estable la molécula de anticuerpo se pueden modificar por ingeniería genética. En lugar de usar vectores de expresión contienen orígenes de replicación virales, células huésped se pueden transformar con ADN controlado mediante la expresión adecuada de elementos de control (*por ejemplo*, sitios del promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, poliadenilación, *etc.*), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, se puede permitir que las células sometidas a ingeniería genética crezcan durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y que crezcan para formar focos que a su vez se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Este método se puede usar ventajosamente para someter a ingeniería genética a las líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Dichas líneas celulares metidas en feria genética pueden ser particularmente útiles en la identificación sistemática y la evaluación de composiciones que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Se pueden usar un número de sistemas de selección, que incluyen pero no se limitan a, los genes de timidina quinasa del virus del herpes simplex (Wigler y col., 1977, Cell 11: 223), hipoxantinaguanina fosforibosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 202), y adenina fosforibosiltransferasa (Lowy y col., 1980, Cell 22: 8- 17) que se pueden usar en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Además, se puede usar resistencia antimetabolitos como la base de selección para los siguientes genes: *dhfr*, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y col., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77: 357; O'Hare y col., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527); *gpt*, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan y Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072); neo, que confiere resistencia al aminoglicósido G-418 (Wu y Wu, 1991, Biotherapy 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573- 596; Mulligan, Science 260: 926- 932; y Morgan y Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191- 217; Mayo de 1993, TIB TECH 11 (5) : 155- 2 15); e *higro*, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre y col., 1984, Gene 30: 147). Los métodos conocidos normalmente en la técnica de tecnología del ADN recombinante se pueden aplicar de forma rutinaria para seleccionar el clon recombinante deseado, y dichos métodos escriben, por ejemplo, en Ausubel y col. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993) ; Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli y col. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre- Garapin y col., 1981, J. Mol. Biol. 150: 1.

Los niveles expresión de una molécula de anticuerpo se pueden aumentar mediante la amplificación de vectores (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, Nueva York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema de vectores que expresan anticuerpos es amplificable, el aumento en el nivel del inhibidor presente en el cultivo de células huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse y col., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

La célula huésped se puede cotransfectar con dos vectores de expresión de la presente divulgación, codificando el primer vector un péptido derivado de cadena pesada y codificando el segundo vector un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permitan la misma expresión de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, se puede usar un solo vector que codifica, y es capaz de expresar, polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. En dichas situaciones, la cadena ligera se debería colocar por delante de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada sin tóxicos (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; y Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 2197-2199). Las secuencias que codifican las cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que la molécula de anticuerpo de la presente divulgación sea producido por expresión recombinante, se puede purificar mediante cualquier método conocido en la técnica para purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, por cromatografía (*por ejemplo*, intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de Proteína A, y cromatografía en columna de exclusión por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos de la presente divulgación se pueden condensar con secuencias de polipéptidos heterólogos que se describen en el presente documento o que se conocen de otro modo en la técnica para facilitar la purificación.

Kits

- La presente divulgación también proporciona un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más envases rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación, tales como uno más anticuerpos proporcionados en el presente documento. Asociado opcionalmente con dicho envase o envases puede haber una notificación en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuya notificación refleja la aprobación de la agencia de fabricación, uso o venta para administración en seres humanos.
- La presente divulgación proporciona kits se pueden usar en los procedimientos anteriores. En una realización, un kit comprende un anticuerpo tal como se describe en el presente documento, preferentemente un anticuerpo purificado, en uno o más envases. En una realización específica, los kits de la presente divulgación contienen un antígeno de hLIGHT básicamente aislado como un control. Preferentemente, los kits de la presente divulgación comprenden adicionalmente un anticuerpo de control que no reacciona con el antígeno de hLIGHT. En otra realización específica, los kits de la presente divulgación contienen un medio para detectar la unión de un anticuerpo modificado a un antígeno de hLIGHT (*por ejemplo*, el anticuerpo se puede conjugar con un sustrato detectable tal como un compuesto fluorescente, un sustrato enzimático, un compuesto radiactivo o un compuesto luminiscente, o un segundo anticuerpo que reconoce que el primer anticuerpo se puede conjugar con un sustrato detectable). El kit puede incluir un antígeno de hLIGHT producido de forma recombinante o sintetizado químicamente. El antígeno de hLIGHT se proporciona en el kit también puede estar unido a un soporte sólido. Los medios de detección del kit que se ha descrito anteriormente pueden incluir un soporte sólido al que se une el antígeno de hLIGHT. Dicho kit también puede incluir un anticuerpo anti-humano marcado con indicador no unido. La unión del anticuerpo al antígeno de hLIGHT se puede detectar mediante la unión de dicho anticuerpo marcado con indicador.
- Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Generación de Anticuerpos Anti-hLIGHT Humanos

- En este ejemplo, se describe la generación de anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT humanos usando ratones transgénicos (ratones KMTM) (documento WO 02143478, documento WO 02/092812, Ishida y Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2000); y Kataoka, S. IBC's 13th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2002)) inmunizados con hLIGHT recombinante soluble. Los anticuerpos que se describen aquí tiñeron específicamente líneas celulares transfectadas con hLIGHT de forma estable, (EL4-hLIGHT y HEK 293- hLIGHT) y no las líneas celulares precursoras. De forma análoga, se unen con hLIGHT expresado de forma endógena sobre la superficie del hibridoma de linfocitos T humanos (II-23,D7) (Ware y col. 1986 Lymphokine Res 5 313- 24) después de la activación. En conjunto, estos datos indican que los anticuerpos se unen de forma inmunoespecífica a hLIGHT. Los anticuerpos aislados reconocen uno o dos epítomos en hLIGHT tal como se determina mediante experimentos de bloqueo cruzado, tal como se describe a continuación. Además, los anticuerpos fueron capaces de bloquear hLIGHT expresado en la superficie celular que se une a formas de fusión de Fc del receptor soluble tanto de HVEM humano como del LTβR. hLIGHT soluble induce la secreción de las quimioquinas CCL20 y RANTES a partir de la línea celular HT29.14s epitelial de colon humano (ATCC HTB-38) de una manera dependiente de la dosis. La incubación de hLIGHT soluble con anticuerpos anti-hLIGHT bloquea la secreción mediada por hLIGHT tanto de CCL20 como de RANTES a partir de células HT29.14s. Además, la incubación previa de hLIGHT expresado la superficie celular (EL4-hLIGHT) con estos anticuerpos de anti-hLIGHT bloquea la secreción de quimioquinas inducidas por hLIGHT unidas a membranas a partir de células HT29. En conjunto, estos resultados ilustran características funcionales y estructurales de los anticuerpos monoclonales anti- hLIGHT totalmente humanos y proporcionan evidencias de su utilidad en el tratamiento de enfermedad mediadas por hLIGHT.

Materiales y Métodos

- Preparación de antígenos: El antígeno usado para inmunizaciones en la generación de anticuerpos anti-hLIGHT totalmente humanos fue una versión soluble de hLIGHT que se trunca para incluir solamente la región extracelular, partiendo de la glicina en la posición 66 del aminoácido a Valina 240, y contiene una marca de epítomo de FLAG en el extremo amino de la proteína (SEC ID N°: 54). La producción de esta molécula se ha informado anteriormente (Rooney y col. 2000 J Biol Chem 275 14307-15).

- El ácido nucleico (SEC ID N°: 51) que codifica la secuencia de aminoácidos de hLIGHT de longitud total (SEC ID N°: 52) se ha clonado a partir de células de hibridomas de linfocitos T II23.D7 activados por transcriptasa inversa-PCR (Mauri y col. 1998 Immunity 8 21-30). La línea celular II-23 (un subclon de D7) es un hibridoma de linfocitos T CD4+ humanos (Ware y col. 1986 Lymphokine Res 5 313-24). El producto de PCR de hLIGHT se subclonó en el vector pcDNA3.1 (+) de expresión en mamíferos para crear PcDNA3.1-hLIGHT. El dominio extracelular (que codifica de Gly66 a Val240) se amplificó a partir de pcDNA3-hLIGHT de PCR usando los siguientes cebadores con sitios de restricción incorporados:

ES 2 439 994 T3

directo, 5' -GTAGGAGAGATGGTCACCCGCCT-3' (SEC ID N°: 80).

inverso, 5' -GGAACGCGAATTCCCACGTGTCAGACCCATGTCCAAT-3' (SEC ID N°: 81).

5 El producto de PCR de hLIGHT amplificado se digirió con EcoRI y se ligó en los sitios SnaB1 y EcoRI de pCDNA3.1-VCAM-FLAG, que codifica la secuencia directora de VCAM1 seguido por el epítipo de FLAG para la producción de proteína segregada, marcada con FLAG de forma N-terminal (SEC ID N°: 52).

10 Para producir una línea celular estable para la producción de hLIGHT soluble, se transfectaron células HEK293 usando el método de fosfato de calcio, y se seleccionaron clones estables con G418 (Invitrogen, Corp.) y se identificó sistemáticamente la producción de hLIGHT por ELISA. El bLIGHT soluble se purificó a partir de sobrenadantes de cultivos de células cultivadas en DMEM que contenía suero bovino fetal definido al 1,0 % (Hyclone Laboratories, Logan, UT). El hLIGHT soluble se purificó por cromatografía de afinidad con anticuerpo anti- FLAG (M2) acoplado a perlas de agarosa. El hLIGHT soluble se eluyó a partir de la columna usando glicina 20 mM, NaCl 150 mM, pH 3,0, y pH neutralizado inmediatamente por recogida en Tris 50 mM, pH 7,4. La concentración de proteínas se determinó por absorbancia a 280 nm.

15 Secuencia de nucleótidos de un hLIGHT a partir del codón de iniciación (ATG) al (TGA) de terminación (SEC ID N°: 51):

```

ATGGAGGAGA GTGTCGTACG GCCCTCAGTG TTTGTGGTGG ATGGACAGAC CGACATCCCA 60
TTCACGAGGC TGGGACGAAG CCACCGGAGA CAGTCGTGCA GTGTGGCCCG GGTGGGTCTG 120
GGTCTCTTGC TGTGCTGAT GGGGGCCGGG CTGGCCGTCC AAGGCTGGTT CCTCCTGCAG 180
CTGCACTGGC GTCTAGGAGA GATGGTCAÇC CGCCTGCCTG ACGGACCTGC AGGCTCCTGG 240
GAGCAGCTGA TACAAGAGCG AAGGTCTCAC GAGGTCAACC CAGCAGCGCA TCTCACAGGG 300
GCCAACTCCA GCTTGACCGG CAGCGGGGGG CCGCTGTTAT GGGAGACTCA GCTGGGCCCTG 360
GCCTTCCTGA GGGGCCTCAG CTACCACGAT GGGGCCCTTG TGGTCACCAA AGCTGGCTAC 420
TACTACATCT ACTCCAAGGT GCAGCTGGGC GGTGTGGGCT GCCCGCTGGG CCTGGCCAGC 480
ACCATCACC ACCGGCCTCTA CAAGCGCACA CCCCCTACC CCGAGGAGCT GGAGCTGTTG 540
GTCAGCCAGC AGTCACCCTG CGGACGGGCC ACCAGCAGCT CCCGGGTCTG GTGGGACAGC 600
AGCTTCCTGG GTGGTGTGGT ACACCTGGAG GCTGGGGAGG AAGTGGTCGT CCGTGTGCTG 660
GATGAACGCC TGGTTCGACT GCGTGATGGT ACCCGGTCTT ACTTCGGGGC TTTCATGGTG 720
TGA 780
    
```

20

Secuencia de aminoácidos de 240 aa de hLIGHT de longitud total (SEC ID N°: 52):

```

MEESVVRPSV FVVDGQTDIP FTRLGRSHRR QSCSVARVGL GLLLLLLMGAG LAVQGWFLQ 60
LHWRLGEMVT RLPDGPAGSW EQLIQERRSH EVNPAHLTG ANSSLTGSGG PLLWETQLGL 120
AFLRGLSYHD GALVVTKAGY YYIYSKVQLG GVGCPGLAS TITHGLYKRT PRYPELELL 180
VSQQSPCGRA TSSSRVWWS SFLGGVVHLE AGEVVVVRVL DERLVRLRDG TRSYFGAFMV 240
    
```

25

Secuencia de nucleótidos de un hLIGHT soluble marcado con FLAG (se muestran las secuencias directoras de VCAM, seguido de la secuencia que codifica FLAG en negrita) (SEC ID N°: 53)

ATGCCTGGGA AGATGGTCGT GATCCTTGGG GCCTCAAATA TACTTTGGAT AATGTTTGCA 60
GCTTCTCAAG CTGACTACAA GGACGACGAT GACAAGTACG TAGGAGAGAT GGTACCCCGC 120
 CTGCCTGACG GACCTGCAGG CTCCTGGGAG CAGCTGATAC AAGAGCGAAG GTCTCACGAG 180
 GTCAACCCAG CAGCGCATCT CACAGGGGCC AACTCCAGCT TGACCCGGCAG CGGGGGGCCG 240
 CTGTTATGGG AGACTCAGCT GGGCCTGGCC TTCCTGAGGG GCCTCAGCTA CCACGATGGG 300
 GCCCTTGTGG TCACCAAAGC TGGCTACTAC TACATCTACT CCAAGGTGCA GCTGGGCGGT 360
 GTGGGCTGCC CGCTGGGCCT GGCCAGCACC ATCACCACG GCCTCTACAA GCGCACACCC 420
 CGTACCCCG AGGAGCTGGA GCTGTTGGTC AGCCAGCAGT CACCCTGCGG ACGGGCCACC 480
 AGCAGCTCCC GGGTCTGGTG GGACAGCAGC TTCCTGGGTG GTGTGGTACA CCTGGAGGCT 540
 GGGGAGGAGG TGGTCGTCCG TGTGCTGGAT GAACGCCTGG TTCGACTGCG TGATGGTACC 600
 CGGTCTTACT TCGGGGCTTT CATGGTGTGA 660

Secuencia de aminoácidos de 183 aa de un hLIGHT soluble marcado con FLAG (FLAG en negrita) (SEC ID N°: 54):

DYKDDDDKGE MVTRLPDGPA GSWEQLIQR RSHEVNPAAH LTGANSSTLG SGGPLLWETQ 60
LGLAFLRGLS YHDGALVVK AGYYYYYSKV QLGGVGCPLG LASTITHGLY KRTPRYPEEL 120
ELLVSQQSPC GRATSSSRVW WDSSFLGGVV HLEAGEEVVV RVLDERLVRL RDGTRSYFGA 180
FMV 240

5

Células EL4 (ATCC TIB-39) se transdujeron de forma estable con un retrovirus que contiene el ADNc que codifica hLIGHT de longitud total para la generación de la línea celular de EL4-hLIGHT.

10 Preparación de la proteína de fusión Fc: La clonación, expresión, y purificación de las proteínas de fusión del receptor soluble que contienen la región Fc de la IgG1 humana y los dominios de unión a ligandos de LTβR humano y HVEM humano se han descrito anteriormente (Rooney y col. 2000 Methods Enzymol 322 345-63). En resumen, las regiones extracelulares de HVEM y el LTβR se aislaron mediante reacciones en cadena de la polimerasa usando cebadores con sitios de endonucleasas con restricción incorporada y ligandos dentro de marco en el vector pVL1392 de baculovirus (Pharming) que contiene la IgG1 de Fc humano. Células de insecto BTI-TN-5b1-4 de *Trichoplusia ni* (Tn5) en High-Five (Invitrogen Corp.) se infectaron con los baculovirus recombinantes de LTβR:Fc o HVEM:Fc para producción de proteínas (véase purificación de anticuerpos y proteínas).

20 Ratones: Ratones KMTM transcromosómicos humanos (documento WO 02/43478, documento WO 02/092812, Ishida y Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2000); y Kataoka, S. IBC's 13th Antibody Engineering Meeting. Abstract (2002)) que albergaban fragmentos de cromosomas humanos que codifican la región de la inmunoglobulina humana se obtuvieron a partir de Kirin Brewery Co., Ltd., Japón, y se alojaron en las instalaciones animales en Gemini Science (La Jolla, CA). Una visión general de la tecnología para producir anticuerpos humanos se describe en Lonberg y Huszar 1995 Int Rev Immunol 13 65-93. Animales transgénicos con uno o más genes de inmunoglobulina humana (kappa o lambda) que no expresan inmunoglobulinas endógenas se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.939.598. Se describen métodos adicionales para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos (véase, *por ejemplo*, documento WO 98/24893; documento WO 92/01047; documento WO 96/34096; documento WO 96/33735; Patentes de Estados Unidos N° 5.413.923; N° 5.625.126; N° 5.633.425; N° 5.569.825; N° 5.661.016; N° 5.545.806; N° 5.814.318; N° 5.885.793; N° 5.916.771; y N° 5.939.598). El desarrollo de genes de inmunoglobulina humana que portan información bovina, vacas TC, se describe en Ishida y Lonberg (véase Ishida 2000 11th Antibody Engineering Meeting, Kuroiwa y col. 2004 Nat Genet 36 775- 80, Kuroiwa y col. 2002 Nat Biotechnol 20 889-94).

35 Inmunización: Proteína recombinante de hLIGHT soluble marcado con FLAG se mezcló con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (CFA, Sigma) y se preparó una emulsión. Se inmunizaron ratones con 10 a 50 µg de proteína por vía subcutánea (s.c.) y se reforzó s.c. con 10 a 20 µg de proteína emulsionada en adyuvante incompleto de Freund (IFA, Sigma) a intervalos de 2-3 semanas para 2 a 3 refuerzos. Una inyección final intravenosa (i.v.) de 20 µg de hLIGHT soluble marcado con FLAG sin adyuvante se administró 3 días antes de la fusión 3.

40 Producción de Hibridomas: Los ratones que presentaban el título de anticuerpo específico de IgG anti-hLIGHT más elevado en su suero, tal como se determina por los ELISA de hLIGHT y FACS usando células EL4 transducidas por hLIGHT frente a células precursoras de EL4, se seleccionaron para la producción de anticuerpos monoclonales. Los bazoos se recogieron y suspensiones de células individuales se condensaron con la línea celular de mieloma SP2/O-

- Ag14 (ATCC, Manassas, VA) a una relación de 5:1 con polietilenglicol al 50 % (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Las fusiones se sembraron en placas de fondo plano de 96 pocillos a una densidad óptima (aquí 1×10^6 /ml) en medio completo de DMEM-10 (Medio de Eagle Modificado con Dulbecco con suero bovino fetal al 10 % (FBS, Invitrogen, Corp.), aminoácidos no esenciales al 1 %, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de sulfato de estreptomina (todo de BioWhittaker, Walkersville, MD), suplemento de HAT (Sigma), y Factor para Clonación de Hibridomas al 10 % (HCF, Biovaris, San Diego, CA)) y se cultivó a 37 °C en una incubadora con CO₂ al 10 %. 2800 pocillos a partir de 2 fusiones se identificaron sistemáticamente por ELISA para anticuerpos específicos de hLIGHT que contenían kappa humana. Los anticuerpos de IgG anti-hLIGHT humana se confirmaron mediante análisis por citometría de flujo usando células hLIGHT-EL4 frente a células precursoras EL4. Los pocillos positivos también se sometieron a ensayo para la actividad de bloqueo de receptores por incubación previa de medios de crecimiento de cultivos de extinción de hibridoma crudo con células EL4-hLIGHT y se hizo tinción con HVEM:Fc o LTβR:Fc de semisaturación. Los pocillos positivos se expandieron y se sometieron a 3 - 5 rondas de clonación por dilución limitante para obtener anticuerpos monoclonales.
- 15 Purificación de anticuerpos y proteínas: Para la purificación de anticuerpos, se cultivaron hibridomas en frascos rotatorios de 2 litros en 350 mililitros a 1 litro/botella o en un sistema Integra de 1 litro (INTEGRA Bioscience, Inc., Ijamsville, MD) con medio de hibridoma-SFM (Invitrogen, Corp.) complementado con suero bovino fetal de IgG ultra baja (Invitrogen, Corp.).
- 20 La producción de proteínas recombinantes de LTβR:Fc y HVEM:Fc de ser humano y ratón se han informado anteriormente (Rooney y col. 2000 Meth. Enzymol. 322: 345-63) y se generaron por infección de 1 litro de células Tn5 en suspensión durante 4 días. Tanto los anticuerpos monoclonales humanos como las proteínas de fusión Fc se purificaron a partir de medios de cultivo usando gel de Proteína A recombinante-Sefarosa de Flujo Rápido (Amersham Biosciences). El medio acondicionado generado en botellas rotatorias primero se concentró usando un sistema de flujo tangencial Ultrasette (Pall Corp., East Hills, NY). El medio acondicionado se filtró con una unidad de filtros de vacío de 0,22 µm (Millipore, Bedford, MA) y se cargó sobre una columna de Proteína A-Sefarosa de Flujo Rápido (Amersham Biosciences) de tamaño apropiado para la cantidad de anticuerpo humano en el medio. La columna se lavó minuciosamente con 20 volúmenes de columna de PBS y el anticuerpo se eluyó con Gly-HCl 0,1 M, pH 3,6, NaCl 0,15 M y se neutralizó con Tris-HCl 1 M, pH 8,0. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y las
- 30 cárceles positivas se combinaron y se concentraron con un concentrador centrífugo (Vivaspin, 50,000 MWCO: Sartorius, Gettingen, Alemania).
- Columnas de desalinización Sephadex G-25, (NAP, Amersham Biosciences), se usaron para el intercambio de tampón a PBS, pH 7,4. Finalmente, el anticuerpo se esterilizó por filtración usando filtros de jeringa con diámetros de
- 35 poro de 0,22 µm y la concentración del anticuerpo se determinó mediante el método de Lowry. El contenido de pirógenos se determinó usando un ensayo de Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA). Los límites de detección de este ensayo son 0,06 EU/mg. Si el ensayo era negativo, las muestras se consideraban sin endotoxinas.
- 40 ELISA para la cuantificación de IgG Humana: Para determinar la cantidad de anticuerpo humano presente en sobrenadantes y soluciones de reserva purificadas, se usó el siguiente protocolo. Anticuerpo específico de Fcγ anti-humano de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) se revistió en las placas de 96 pocillos (Nunc, Denmark) en tampón de carbonato a 0,5 µg/pocillo durante 1 hora a 37 °C. Las placas se bloquearon a continuación con Super block (Pierce, Rockford, IL) durante 30 minutos seguido de la adición de las muestras a las
- 45 placas. Se generaron curvas convencionales usando IgG humana total (Sigma) o IgG1 o IgG4 humana purificada (Kirin Brewery Co., Ltd). Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C, se lavaron en PBS/BSA al 1 %/ Tween 20 al 0,1 % (Sigma), y el anticuerpo unido se detectó con anticuerpo específico de Fcγ anti-humano de cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP, Jackson ImmunoResearch Laboratorie, West Grove, PA) durante 1 hora a 37 °C. El sustrato de TMB (Sigma) se añadió durante 10 minutos y la reacción se detuvo con H₂SO₄ (LabChem, Pittsburgh, PA). La DO se midió a 450 nm en un lector de microplacas.
- 50 Cultivo celular de mamíferos: La línea celular II-23 humana (subclon D7), una línea de hibridoma de linfocitos T CD4+ (Ware y col. 1986 Lymphokine Res 5 313-24), se mantuvo en RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % (HyClone Laboratories, Logan, UT) y 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina (Life Technologies, Grand Island, NY). La línea celular HT29.14s humana, la línea celular de EL4-hLIGHT y la línea celular 293-hLIGHT se mantuvieron todas en DMEM que contenía FBS al 10 % (HyClone Laboratories, Logan, UT). Todas las células de mamífero se cultivaron en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C.
- 60 ELISA para la detección de anticuerpo Anti-hLIGHT: Títulos de anticuerpo, especificidad, y producción por hibridomas se determinaron por ELISA. En resumen, placas de fondo plano de 96 pocillos se revistieron con 50 µl de hLIGHT soluble marcado con FLAG a 5 µg/ml en tampón de carbonato (pH 9,4) durante una noche a 4 °C o a 37 °C durante 1 hora. Después de lavar dos veces con PBS/Tween 20 al 0,1 %, las placas se bloquearon con PBS/BSA al 1 %/Tween 20 al 0,1 % a 37 °C durante 1 hora. El suero, sobrenadante, o anticuerpo purificado se diluyó en tampón de bloqueo, se añadió los pocillos, y las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron 4 veces
- 65 con PBS/Tween 20 al 0,1 % y el anticuerpo de detección kappa antihumano de oveja conjugado con peroxidasa

(The Binding Site, Birmingham, Reino Unido) se añadió a una dilución de 1:2000. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, las placas se lavaron y se añadió el sustrato de TMB (Sigma) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos. La reacción se detuvo con H₂SO₄ (LabChem) y un lector de microplacas midió la densidad óptica a 450 nm.

5 Citometría de flujo: Títulos de anticuerpo, especificidad, y afinidades de unión relativas se determinaron por análisis por citometría de flujo usando líneas celulares translúcidas de EL4 estables a hLIGHT o un PMA de 6-15 h (40 ng/ml) + línea de linfocitos T II23.D7 activados con inonomicina (500 ng/ml). Las células se lavaron una vez en tampón de tinción: PB S + FBS al 2 % + NaN₃ al 0,01 % + EDTA 10 mM, a continuación se volvieron a suspender en suero, sobrenadante, o anticuerpos purificados en un volumen de 50 µl. Las células se incubaron con los anticuerpos en hielo durante 20 minutos, se lavaron dos veces en tampón de tinción, a continuación se volvieron a suspender en un anticuerpo secundario marcado con IgG anti-humana de cabra-APC (Anti-humano de burro-APC, Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). Después de una incubación de 20 minutos en hielo, las células se lavaron una vez y se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído al 1 % o se sometieron a un lavado final, a continuación las células volvieron a suspender en tampón de tinción y las muestras se adquirieron usando citómetros de flujo FACScan o FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences, Palo Alto, CA). Los datos se analizaron usando el software CELLQUEST (Becton Dickinson Biosciences) o FLOW JO (TreeStar, Inc., San Carlos, CA).

20 Ensayos de bloqueo cruzado de anticuerpo anti-hLIGHT: Se usó un protocolo de ELISA para determinar si los anticuerpos se unían al mismo epítipo de hLIGHT. Placas para ELISA de fondo plano de 96 pocillos de NUNC se revistieron con los anticuerpos anti-hLIGHT humanos en tampón de carbonato a 2 µg/ml durante 1 hora a 37 °C. las placas se lavaron el continuación se bloquearon con PBS/BSA al 1 %/Tween 20. Los anticuerpos anti-hLIGHT humanos después se volvieron a incubar previamente con hLIGHT soluble marcado con FLAG humano recombinante durante 30 minutos a 4 °C. las combinaciones de anticuerpo-proteína de hLIGHT se añadieron a la placa y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Después de 3 lavados, se detectó el hLIGHT unido con M2 conjugado con peroxidasa - Ig con marca de epítipo anti-FLAG de ratón (Sigma). El porcentaje de inhibición se determinó usando la DO de cada muestra con la siguiente fórmula: % de inhibición = (máx - muestra/máx) *100.

30 Análisis de citoquinas humanas. Un panel de panel 8 citoquinas humanas en los medios de crecimiento de células HT29.14s tratadas se midió usando tecnología multiplex y siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). La detección de CCL20 en los medios de cultivo de células HT29.14s se realizó por ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN) usando las instrucciones del fabricante.

35 Ensayo *in vitro* para bloqueo mediado por anticuerpos de LIGHT expresaron la superficie celular uniéndose a proteínas de fusión Fc del receptor soluble. Células 1e5 EL4 hLIGHT se incubaron con concentraciones graduadas de cada anticuerpo durante 30 minutos a 4 °C. Cantidades de subsaturación de HVEM:Fc-biotina (3 µg/ml) o LTβR:Fc-His (3 µg/ml) (Alexis Biochemicals) se añadieron a continuación a las células y se incubaron durante 30 minutos a 4 grados C. las células se lavaron a continuación 2x con 200 µl de tampón FACS (1 x PBS FBS al 2 % + azida al 0,02 %). HVEM:Fc-biotina o LTβR:Fc-His se detectaron mediante una incubación de 30 minutos con SA-APC a 2,5 µg/ml o anti-His-HRP respectivamente. Las células se analizaron a continuación en citómetros de flujo FACScaliber (Becton Dickinson). Las células muertas se descartaron a partir de la representación de la dispersión frontal frente a la dispersión lateral y las medias geométricas para cada histograma se calcularon usando FLOWJO (TreeStar, San Carlos, CA, Estados Unidos).

45 Aislamiento de genes de anticuerpo anti-hLIGHT humano. Células de hibridoma cultivadas (124E63, 124F23, 124E1, 124E13 y 124F19), que producen anticuerpos E63 (IgG3), F23 (IgG4), E1 (IgG1), E13 (IgG1) y F19 (IgG1), respectivamente, se recogieron por centrifugación. El ARN total RNA se purificó a partir de estas células usando el kit RNEASY (QIAGEN Inc., Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El Kit de Amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech Co., Ltd., Palo Alto, CA) se usó para la clonación de ADNc que codifica la región variable de los genes de inmunoglobulina a partir de ARN celular del hibridoma total. En resumen, una primera hebra de ADNc se preparó por transcriptasa inversa a partir de 2 microgramos de ARN. Este ADNc se usó como un molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la región variable y una parte de la región constante de las cadenas pesada y ligera (VH y VL, respectivamente). Los cebadores 3' usados para la amplificación de los genes de la cadena pesada y ligera en las reacciones RACE en la posición 5' fueron HH-2 (SEC ID N°: 64) (región constante de la cadena H) y HK-2 (SEC ID N°: 65) (región constante de la cadena ligera), respectivamente. Las secuencias amplificadas también contenían las secuencias directoras. La reacción fue como sigue a continuación: 2,5 unidades de PFU ULTRA ADN polimerasa (Stratagene La Jolla, CA); Cebador en la posición 3' 0,2 µM (para la Cadena pesada: IgG1p, para la cadena ligera: hk5, Tabla 2); 1X de Mezcla A de Cebador Universal al extremo 5' (mezcla A de cebador UMP incluida en el Kit SMART RACE); mezcla de dNTP 200 µM; MgCl₂ 1 mM; Tampón Puff Ultra (la concentración final es 1x); y molde de ADNc.

65 El programa de termociclado fue de 5 ciclos de: 94 °C x 30 seg, 72 °C x 3 min. 5 ciclos de: 94 °C x 30 seg, 70 °C x 30 seg, 72 °C x 3 min. 25 ciclos de: 94 °C x 30 seg, 68 °C x 30 seg, 72 °C x 3 min seguido de una extensión a 72 °C x 7 min. Los fragmentos de ADN amplificado se recogieron mediante electroforesis en gel de agarosa, y se purificó con el Kit de Extracción de Gel QIAQUICK (Qiagen Co., Ltd., Alemania). Fragmentos de ADN purificado de VH y LV

se integraron en vector de PCR 4 Blunt-TOPO usando el Kit para Clonación Zero Blunt TOPO PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA), y cada plásmido de construcción se transformó en *E. coli*, y a continuación se clonó. Secuencias de nucleótidos de cada inserto (HV y LV) en los plásmidos del constructo se analizaron usando cebadores M13F de vector universal específico (SEC ID N°: 58) y M13R (SEC ID N°: 59). Basándose en la secuencia obtenida a partir de 5 VH y VL, se diseñaron cebadores de oligonucleótidos para amplificar los VH y VL respectivos (véase la Tabla 2).

ADNc que codifican VH y VL de E63, F23, E1 y F19 se subclonaron por PCR a partir de los vectores PCR4 Blunt-TOPO en el vector de expresión de IgG1. Debido a que E13 era un subtipo de IgG1 con hibridoma de una sola cadena kappa (véase a continuación), no hubo necesidad de subclonar el ADNc de E13 en un vector de IgG1 para 10 los análisis adicionales.

En primer lugar, cebadores de oligonucleótidos que contienen sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de Sall en la posición 5' y de NheI en la posición 3' se diseñaron para amplificar la región variable de la cadena pesada (VH) por PCR. Por ejemplo, en el caso de E63VH, PCR se realizó usando ADN con pTopoE63VH miniprep como un molde, E63HF85 (SEC ID N°: 60) y E63HR38 (SEC ID N°: 61), cebadores (véase la Tabla 2) con PFU ULTRA ADN polimerasa. Después de digestión con NheI y Sall, el producto de PCR se subclonó en el vector de expresión de IgG1 (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, N5KG1-Val Lark (un vector modificado de N5KG1 (Patente de Estados Unidos N° 6.001.358)) que se digirió previamente con NheI y Sall (fragmento de ADN de 8,9 kilobases). La existencia de VH se analizó por digestión de restricción. 15 20

A continuación, cebadores de Oligonucleótidos que contienen sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de BglII en la posición 5' y de BsiWI en la posición 3' se diseñaron para amplificar la región variable de la cadena ligera (VL) por PCR. Por ejemplo, después de la subclonación del E63VH que se ha descrito anteriormente, el E63VL se insertó en el vector N5KG1-Val Lark-VH por digestión del vector de ADN con BglII y BsiWI. El fragmento de ADN de 25 9,1 kb se aisló a continuación. De una manera similar a la del constructor de VH, un conjunto de cebadores para PCR de VL diseñó para contener los sitios de reconocimiento para 5'BglII y 3'BsiWI. Estos cebadores, E63LF84 (SEC ID N°: 62) y E63LR43 (SEC ID N°: 63), se usaron para amplificar VL a partir del ADN de plásmido de pTopoE63VL miniprep. El producto de PCR se digirió con BglII y BsiWI y se aisló por electroforesis en gel de agarosa y purificación en gel. Este fragmento, que contiene E63VL, se ligó con el vector de 9,1 kb preparado con ADN ligasa de T4 y se usó para transformar células Top10 (Invitrogen). Se seleccionaron transformantes positivos de *E.coli*. Este vector de expresión, pG1K112E63, se purificó, y la presencia de las regiones tanto E63VL como E63VH se confirmaron por análisis de restricción. 30

La generación de vectores para producir anticuerpos recombinantes F23G1, E1G1 y F19G1 se realizó básicamente de la misma manera que para E63G1. La amplificación por PCR del F23VH se realizó usando F23HF86 (SEC ID N°: 35 66) y F23HR55 (SEC ID N°: 67). Los cebadores de amplificación de F23VL fueron F23LF36 (SEC ID N°: 68) y F23LR43 (SEC ID N°: 69). La amplificación por PCR del E1VH se realizó usando E1HFSall (SEC ID N°: 70) y E1HRNheI (SEC ID N°: 71). La amplificación por PCR de E1VL kappa(A), E1VL kappa(B) y E1VL kappa(C) se realizó usando E1KF2+3BglII (SEC ID N°: 74) emparejado con E1KR2BsiWI (SEC ID N°: 75) o E1KR3BsiWI (SEC ID N°: 76). La amplificación por PCR de F19VH se realizó usando F19HFSall (SEC ID N°: 72) and F19HRNheI (SEC ID N°: 73). La amplificación por PCR de F19L kappa (A) y F19L kappa(B) se realizó usando F19KR1+2BsiWI (SEC ID N°: 77) y F19KF1+2+3BglII (SEC ID N°: 79). La amplificación por PCR de F19L kappa(C) se realizó usando F19KR3BsiWI (SEC ID N°: 78) y F19KF1+2+3BglII (SEC ID N°: 79). Los vectores resultantes, pKLG1/F23, pKLG1/E1 y pKLG1/F19 también se confirman mediante la digestión con enzimas de restricción y secuenciación. 40 45 F19L kappa(D) no se amplificó por PCR debido a un desplazamiento en el marco de lectura, que se detectó mediante análisis de secuencias, que produjo un segmento C-terminal del anticuerpo.

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable de la cadena pesada E63 (VH) (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 43):

ES 2 439 994 T3

ATGAAACACC TGTGGTTCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT CCTGTCCCAG
60
GTGCAGCTGC AGGAGTCGGG CCCAGGACTG GTGAAGCCTT CGGAGACCCT GTCCCTCACC
120
TGCATTGTCT CTGGTGGCTC CGTCAGCAGT GGTGGTTACT ACTGGAGCTG GATCCGGCAG
180
CCCCCAGGGA AGGGACTGGA GTGGATTGGG TATATCTATT ACAGTGGGAG CACCAACTAC
240
AACCCCTCCC TCAAGAGTCG AGTCACCATA TCAGTAGACA CGTCCAAGAA CCAGTTCTCC
300
CTGAAGCTGA GCTCTGTGAC CGCTGCGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGATGGATT
360
ACTATGTTTC GGGGAGTTGG GTTCGACCCC TGGGGCCAGG GAACCCTGGT CACCGTCTCC
420
TCA
480

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable de la cadena ligera kappa E63 (VL) (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 48):

5

ATGTCGCCAT CACAACATCAT TGGGTTTCTG CTGCTCTGGG TTCCAGCCTC CAGGGGTGAA 60
ATTGTGCTGA CTCAGTCTCC AGACTTTCAG TCTGTGACTC CAAAGGAGAA AGTCACCATC 120
ACCTGCCGGG CCAGTCAGAG CATTGGTAGT AGCTTACACT GGTACCAGCA GAAACCAGAT 180
CAGTCTCCAA AGCTCCTCAT CAAGTATGCT TCCCAGTCCT TCTCAGGGGT CCCCTCGAGG 240

TTCAGTGGCA GTGGATCTGG GACAGATTTT ACCCTCACCA TCAATAGCCT GGAAGCTGAA 300
GATGCTGCAG CATATTACTG TCATCAGAGT AGTAGTTTAC CTCTCACTTT CGGCGGAGGG 360
ACCAAGGTGG AGATCAAA 420

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable de la cadena pesada F23 (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 45):

10

ATGGACCTCC TGCACAAGAA CATGAAACAC CTGTGGTTCT TCCTCCTCCT GGTGGCAGCT 60
CCCAGATGGG TCCTGTCCCA GGTGCAGCTA CAGCAGTGGG GCGCAGGACT GTTGAAGCCT 120
TCGGAGACCC TGTCCCTCAC CTGCGCTGTC TATGGTGGGT CCTTCAGTGG TTACTIONTGG 180
AACTGGATCC GCCAGCCCCC AGGGAAGGGG CTGGAGTGGÀ TTGGGGAAAT CAATCAGTAC 240
AACCCGTCCC TCAAGAGTCG AGTCACCATA TCAGTAGACA CGTCCAAGAA CCAGTTCTCC 300
CTGAAGCTGA GCTCTGTGAC CGCCGCGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGAGATA 360
GCAACAGCTG ATAAAGGGTA CTACGGTTTG GACGTCTGGG GCCAAGGGAC CACGGTCACC 420
GTCTCCTCA 480

Secuencia de nucleótidos de ADNc de de la región variable de la cadena ligera kappa F23 (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 50):

15

ES 2 439 994 T3

ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT CCCAGGTGCC 60
 AGATGTGCCA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA 120
 GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGGGC ATTAGCAGTG CTTTAGCCTG GTATCAGCAG 180
 AAACCAGGGA AAGCTCCTAA GCTCCTGATC TATGATGCCT CCAGTTTGA AAGTGGGGTC 240
 CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG 300
 CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGT CAACAGTTTA ATAGTTACCC GCTCACTTTC 360
 GGCGGAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAA 420

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable de la cadena pesada E1 (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 41):

5

ATGGAGTTGG GGCTGTGCTG GGTTCCTT GTTGCTATTT TAGAAGGTGT CCAGTGTGAG 60
 GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCTTG GTACAGCCTG GGGGTCCCT GAGACTCTCC 120
 TGTGCAGCCT CTGGATTCAC CTTAGTAGA TTTAACATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA 180
 GGAAGGGGC TGGAGTGGGT TTCATACATT AGTAGTAGTA GTTATACCAT ATACTACGCA 240
 GACTCTGTGA AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATG CCAAGAATC ACTGGATCTG 300
 CAAATGAACA GCCTGAGAGA CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG GAGTATAGCA 360
 GCAGCTTTTG ACTACTGGGG CCAGGGAGCC CTGGTCACCG TCTCCTCA 420

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable N° 1 de la cadena ligera kappa E1 (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 102):

10

ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT CCCAGGTGCC 60
 AGATGTGCCA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA 120
 GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCAGGGC ATTAGCAGTG CTTTAGCCTG GTATCAGCAG 180
 AAACCAGGGA AAGCTCCTAA GCTCCTGATC TATGATGCCT CCAGTTTGA AAGTGGGGTC 240
 CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG 300
 CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGT CAACAGTTTA ATAGTTACCG TACACTTTTG 360
 GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAA 420

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable N° 2 de la cadena ligera kappa E1 (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 46):

15

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTTCTC CTGCTACTCT GGCTCCAGA TACCACCGGA 60
 GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC 120
 CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT TAACCTGGTA CCAGCAGAAA 180
 CCTGGCCAGG CTCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA 240
 GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG 300
 CCTGAAGATT TTGCAAGTGA TTACTGTCAG CAGTATGGTA GCTCAATGTA CACTTTTGGC 360
 CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAA 420

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable N° 3 de la cadena ligera kappa E1 (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 103):

20

ES 2 439 994 T3

```

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA    60
GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC    120
CTCTCCTACA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA    180
CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA ACAGGGCCAC TGGCATCCCA    240
GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG    300
CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTAGTGTCAG CAGTATGGTA GCTCACCGTG GACGTTCCGGC    360
CAAGGGACCA AGGTGGAAT CAAA                                     420

```

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable de la cadena pesada E13 (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 42):

5

```

ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GATTTTCCTT GCTGCGATTT TAAAAGGTGT CCAGTGTGAG
60
GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCCTG GTAAAGCCTG GGGGGTCCCT TAGACTCTCC
120
TGTGCAGCCT CTGGATTCAC TCTCAGTAAC GCCTGGATGA GCTGGGTCCG CCAGGCTCCA
180
GGGAAGGGGC TGGAGTGGGT TGGCCGTATT AAAAGCAAAA TAGATGGTGG GACAACAGAC
240
TACGCTGCAC CCGTGAAAGG CAGATTCACC ATCTCAAGAG ATGATTCAAA AAACACGCTG
300
TTTCTGCAAA TGAACAGCCT GAAAACCGAG GACACAGCCG TGTATTACTG TACCACAGCA
360
ATGGCTGGTG CGTTTGGCTT TTGGGGCCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC CTCA    420

```

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable de la cadena ligera kappa E13 (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 47):

10

```

ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA TACCACCGGA    60
GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC    120
CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA    180
CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA    240
GACAGGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG    300
CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTAGTGTCAG CAGTATGGTA GCTCACCCAT GTACACTTTT    360
GGCCAGGGGA CCAAGCTGGA GATCAAACGA                                     420

```

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable de la cadena pesada F 19 (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 44):

15

ES 2 439 994 T3

ATGAAACACC TGTGGTTCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT CCTGTCCCAG 60
 GTGCAGCTAC AGCAGTGGGG CGCAGGACTG TTGAAGCCTT CGGAGACCCT GTCCCTCACC 120
 TGGCTGTCT ATGGTGGGTC CTTCAAGTGGT TACAAGTGGC ACTGGATCCG CCAGCCCCCA 180
 GGGAAAGGGC TGGAGTGGAT TGGGGAAATC ACTCATAGTG GAAGCACCAA TTACAACCCG 240
 TCCCTCAAGA GTCGAGTCAC CATATCAGTA GACACGTCCA AGAACCAGTT CTCCCTGAAG 300
 CTGAGCTCTG TGACCGCCGC GGACACGGCT GTGTATTACT GTGTGCGAGA GATTGCAGTG 360
 GCTGGTACGG GCTACTACGG TATGGACGTC TGGGGCCAAG GGACCACGGT CACCGTCTCC 420
 TCA 480

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable N° 1 de la cadena ligera kappa F19 (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 104):

5

ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTCCTAC TGCTCTGGGT CCCAGGTGCC 60
 AGATGTGACA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA 120
 GTCACCATCA CTTGCCGGGT GAGTCAGGGC ATTAGCAGTT ATTTAAATTG GTATCGGCAG 180
 AAACCAGGGA AAGTTCCTAA GCTCCTGATC TATAGTGCAT CCAATTTGCA ATCTGGAGTC 240
 CCATCTCGGT TCAGTGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACTAT CAGCAGCCTG 300
 CAGCCTGAAG ATGTTGCAAC TTATTACGGT CAACGGACTT ACAATGCCCC TCCCCTTTC 360
 GGCGGAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAA 420

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable N° 2 de la cadena ligera kappa F19 (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 49):

10

ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT CCCAGGTGCC 60
 AGATGTGCCA TCCAGTTGAC CCAGTCTCCA TCCTCCCTGT CTGCATCTGT AGGAGACAGA 120
 GTCACCATCA CTTGCCGGGC AAGTCGGGGC ATTAACAGTG CTTTTGCCTG GTATCAGCAG 180
 AAACCAGGGA AAGCTCCTAA GCTCCTGATC TATGATGCCT CCAGTTTGA AAGTGGGGTC 240
 CCATCAAGGT TCAGCGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCAGCCTG 300
 CAGCCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGT CAACAGTTTA ATAGTTACCC TCTCACTTTC 360
 GGCGGAGGGA CCAAGGTGGA GATCAAA 420

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable N° 3 de la cadena kappa F19 (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 105):

15

ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTCCTGC TGCTCTGGCT CCCAGGTGCC 60
 AGATGTGTCA TCTGGATGAC CCAGTCTCCA TCCTTACTCT CTGCATCTAC AGGAGACAGA 120
 GTCACCATCA GTTGTCCGAT GAGTCAGGGC ATTAGCAGTT ATTTAGCCTG GTATCAGCAA 180
 AAACCAGGGA AAGCCCTGA GCTCCTGATC TATGCTGCAT CCACTTTGCA AAGTGGGGTC 240
 CCATCAAGGT TCAGTGGCAG TGGATCTGGG ACAGATTTCA CTCTCACCAT CAGCTGCCTG 300
 CAGTCTGAAG ATTTTGCAAC TTATTACTGT CAACAGTATT ATAGTTTCCC GTACACTTTT 360
 GGCCAGGGGA CCAAGCTGGA GATCAAA 420

Secuencia de nucleótidos de ADNc de la región variable N° 4 de la cadena kappa F19 (a partir del codón de iniciación (ATG) hasta el final de la región variable) (SEC ID N°: 106):

20

ATGGAAGCCC	CAGCGCAGCT	TCTCTTCTC	CTGCTACTCT	GGCTCCCAGA	TACCACCGGA	60
GAAATTGTGT	TGACACAGTC	TCCAGCCACC	CTGTCTTTGT	CTCCAGGGGA	AAGAGCCACC	120
CTCTCCTGCA	GGGCCAGTCA	GGGTGTTAGC	AGCTACTTAG	CCTGGTACCA	GCAGAAACCT	180
GGCCAGGCTC	CCAGGCTCCT	CATCTATGAT	GCATCCAACA	GGGCCACTGG	CATCCCAGCC	240
AGGTTCAGTG	GCAGTGGGCC	TGGGACAGAC	TTCACTCTCA	CCATCAGCAG	CCTAGAGCCT	300
GAAGATTTTG	CAGTTTATTA	CTGTCAGCAG	CGTAGCAACT	GGCATCCCCT	TCGGCCAAGG	360
GACCAAGGTG	GAGATTCAAA					420

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada E63 (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 3):

5

MKHLWFFLLL	VAAPRWLSQ	VQLQESGPGI	VKPSETLSLT	CIVSGGSVSS	GGYYSWIRQ	60
PPGKGLEWIG	YIYYSGSTNY	NPSLKSRTI	SVDTSKNQFS	LKLSSVTAAD	TAVYYCARWI	120
TMFRGVGFDP	WGQGLVTVS	S				180

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa E63 (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 8):

10

MSPSQLIGFL	LLWVPASRGE	IVLTQSPDFQ	SVTPKEKVTI	TCRASQSIGS	SLHWYQQKPD	60
QSPKLLIKYA	SQSFSGVPSR	FSGSGGTFD	TLTINSLEAE	DAAAYYCHQS	SSLPLTFGGG	120
TKVEIK						180

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada F23 (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 5):

15

MDLLHKQMKH	LWFFLLLVAA	PRWLSQVQL	QQWGAGLLKP	SETLSLTCAV	YGSFSGYYW	60
NWIRQPPGKG	LEWIGEINQY	NPSLKSRTI	SVDTSKNQFS	LKLSSVTAAD	TAVYYCAREI	120
ATADKGYGL	DVWGQTTVT	VSS				180

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa F23 (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 10):

20

MDMRVPAQLL	GLLLLWLPGA	RCAIQLTQSP	SSLSASVGR	VTITCRASQG	ISSALAWYQQ	60
KPGKAPKLLI	YDASSLESGV	PSRFSGSGG	TDFTLTSSL	QPEDFATYYC	QQFNSYPLTF	120
GGGTKVEIK						180

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada E1 (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 1):

25

MELGLCWVFL	VAILEGVQCE	VQLVESGGGL	VQPGSLRLS	CAASGFTFSR	FNMNWRQAP	60
GKGLEWVSYI	SSSSYTIYYA	DSVKGRFTIS	RDNAKNSLDL	QMNSLRDEDT	AVYYCARSIA	120
AAFDYWGQGA	LTVSS					180

Secuencia de aminoácidos de la región variable N° 1 de la cadena ligera kappa E1 (E1kappa (A)) (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 82):

30

ES 2 439 994 T3

MDMRVPAQLL GLLLLLWLPGA RCAIQLTQSP SLSASVGDV VTITCRASQG ISSALAWYQQ 60
KPGKAPKLLI YDASSLESGV PSRFGSGSGG TDFTLTISL QPEDFATYYC QQFNSYRTLL 120
ARGPSWRS 180

Secuencia de aminoácidos de ADNc de la región variable N° 2 de la cadena ligera kappa E1 (E1kappa (B)) (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 6):

5

METPAQLLFL LLLWLPDITG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLTWYQQK 60
PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSMYTFG 120
QGTKLEIK 180

Secuencia de aminoácidos de ADNc de la región variable N° 3 de la cadena ligera kappa E1 (E1kappa (C)) (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 83):

10

METPAQLLFL LLLWLPDITG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSYRASQSVS SSYLAWYQQK 60
PGQAPRLLIY GASNRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPWTFG 120
QGTKVEIK 180

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada E13 (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 2):

15

MEFGLSWIFL AAILKGVQCE VQLVESGGGL VKPGGSLRLS CAASGFTLSN AWMSWVRQAP 60
GKGLEWVGRI KSKIDGGTID YAAPVKGRFT ISRDDSKNTL FLQMNSLKTE DTAVYYCTTA 120
MAGAFGFWGQ GTLVTVSS 180

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera kappa E13 (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 7):

20

METPAQLLFL LLLWLPDITG EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK 60
PGQAPRLLIY GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPMYTF 120
QGTKLEIKR 180

Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada F19 (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 4):

25

MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQWAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YNWHWIRQPP 60
GKGLEWIGEI THSGSTNYNP SLKSRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCVREIAV 120
AGTGYYGMDV WQGTTVTVS S 180

Secuencia de aminoácidos de ADNc de la región variable N° 1 de la cadena ligera kappa F19 (F19kappa (A)) (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 90):

30

MDMRVPAQLL GLLLLLWVPGA RCDIQLTQSP SLSASVGDV VTITCRVSGG ISSYLNWYRQ 60
KPGKVPKLLI YSASNLSGV PSRFGSGSGG TDFTLTISL QPEDVATYYG QRTYNAPPTF 120
GGGTKVEIK 180

Secuencia de aminoácidos de ADNc de la región variable N° 2 de la cadena ligera kappa F19 (F19kappa (B)) (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 9):

35

ES 2 439 994 T3

MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RCAIQLTQSP SLSASVGDV VTITCRASRG INSAFAWYQQ 60
 KPGKAPKLLI YDASSLESGV PSRFSGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC QQFNSYPLTF 120
 GGGTKVEIK 180

Secuencia de aminoácidos de ADNc de la región variable N° 3 de la cadena ligera kappa F19 kappa (F19kappa (C)) (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 91) :

5

MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RCVIWMQSP SLLSASTGDR VTISCRMSQG ISSYLAWYQQ 60
 KPGKAPPELLI YAASTLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISCL QSEDFATYYC QQYYSFPYTF 120
 GQGKLEIK 180

Secuencia de aminoácidos de ADNc de la región variable N° 4 de la cadena ligera kappa F19 (F19kappa (D)) (secuencia directora (negrita) y región variable) (SEC ID N°: 92) :

10

MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQGVV SYLAWYQQKP 60
 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGGPGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWHPVRPR 120
 DQGGDS 180

Tabla 2: Cebadores de ADN sintetizados

SEC ID N°:	Nombre	Secuencia 5' a 3'	Longitud
55	RACEUPS5'	CTAATACGACTCACTATAGGGC	22-mer
56	IgG1p	TCTTGTCACCTTGGTGTGCTGGGCTTGTG	31-mer
57	HK5	AGGCACACAACAGAGGCAGTTCCAGATTC	30-mer
58	M13F	GTAAAACGACGGCCAGTG	18-mer
59	M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	17-mer
60	E63HF85	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC	41-mer
61	E63HR38	GAGAGAGAGAGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGCT	37-mer
62	E63LF84	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGTCGCCATCACAACCTCATTG	42-mer
63	E63LR43	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC	40-mer
64	HH-2	GCTGGAGGGCACGGTCACCACGCTG	25-mer
65	HK-2	GTTGAAGCTCTTTGTGACGGGCGAGC	26-mer
66	F23HF86	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACCTCCTGCACAAGAAC	41-mer
67	F23HR55	AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGT	34-mer
68	F23LF36	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTC	42-mer
69	F23LR43	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC	40-mer
70	E1HFSall	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGAGTTGGGGCTGTGCTGG	41-mer
71	E1HRNhel	AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGC	37-mer
72	F19HFSall	AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGAAACACCTGTGGTTCTTC	41-mer
73	F19HRNhel	AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCGTGGT	37-mer
74	E1KF2+3BglII	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGAAACCCAGCGCAGCTTC	42-mer
75	E1KR2BsiWI	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCTG	40-mer
76	E1KR3BsiWI	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTG	40-mer
77	F19KR1+2BsiWI	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCACCTTGGTCCCTCC	40-mer

78	F19KR3BsiWI	AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCCTG	40-mer
79	F19KF1+2+3BgIII	AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTC	42-mer

El ratón KMTM se describe, *por ejemplo*, en Fishwild y col. 1996, Nat. Biotechnol. 14: 845-51; Lonberg y col. 2005 Nat. Biotechnol. 9: 1117-1125; Tomizuka y col. 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-7; Tomizuka 1997 Nat Genet. 16: 133-43. Debido a la naturaleza del ratón KMTM (*por ejemplo*, más de un gen de la cadena kappa se integró en el genoma de murino después de la generación de la cepa transgénica) es posible tener más de un ADNc de cadena ligera kappa expresado a partir de un hibridoma clónico. Para determinar si éste es el caso, se secuencian un mínimo de diez clones de ADNc. En los casos en los que se aísla más de un ADNc de anticuerpo de cadena ligera kappa (*por ejemplo*, E1 y F19), se generan varios constructos que contienen los diversos pares de ADNc de cadena pesada combinados con cada ADNc de kappa. Estos constructos de expresión se transfectan en células 293F usando 293-FECTINA (Invitrogen, San Diego, CA). A continuación se someten a ensayo sobrenadantes de cultivos de setenta y dos horas para la actividad de anticuerpos para identificar el par o los pares correctos de la cadena pesada y ligera que se unen de forma inmuno-específica a hLIGHT (*por ejemplo*, por ensayo de transferencia Western, ELISA u otro método similar). Por favor, consultar el Ejemplo 3 que sigue a continuación para un método a modo de ejemplo para caracterizar anticuerpos (*por ejemplo*, E1 y F19) que tienen múltiples cadenas kappa.

Producción de anticuerpo anti-hLIGHT humano recombinante a partir de células 293F: Cultivos en suspensión células 293F se mantuvieron en medio de expresión Freestyle 293 mientras que se agitaba a ~120 rpm/min en una incubadora humidificada con CO₂ al 8 % a 37 °C. Para la expresión transitoria de anticuerpos recombinantes, 3 x 10⁷ células 293F se transfectaron con 30 µg de cada plásmido de codificación de las versiones de IgG1 recombinante de los anticuerpos anti-hLIGHT E63 o F23 usando 293-fectina (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los transfectantes se dejaron crecer en suspensión en 30 ml de medio de expresión FREESTYLE 293 durante 5 días en condiciones normales de crecimiento. El medio de crecimiento se cosechó y las células se retiraron por centrifugación a una velocidad de 300 g seguido de filtración a través de un filtro de 0,22 µm. La concentración de anticuerpos presentes en este material sin purificar se determinó por ELISA y hIgG y se usó para ensayos *in vitro* para evaluar las propiedades funcionales de la subclase anticuerpos cambiados.

Resultados

Ratones KMTM se inmunizaron con hLIGHT marcado con FLAG recombinante soluble en CFA/IFA. Varios de los ratones generaron anticuerpos específicos anti-hLIGHT, con un intervalo en los títulos específicos de hLIGHT de IgG humana medida por tinción mediante análisis de ELISA y FACS de células hLIGHT-EL4. Los esplenocitos de los transmisores más elevados se condensaron con células de mieloma para generar anti-hLIGHT humanos que producen hibridomas. La producción de anticuerpos anti-hLIGHT por los hibridomas individuales se determinó en la identificación sistemática primaria por ELISA para anti-hLIGHT. En esta identificación sistemática, el anticuerpo anti-FLAG se revistió sobre la placa para capturar hLIGHT recombinante marcado con FLAG como un esfuerzo exitoso para enmascarar el epítipo de FLAG y prevenir el aislamiento del anticuerpo anti-FLAG que produce hibridomas. Se usaron medios a partir de clones positivos de ELISA en una identificación sistemática secundaria mediante tinción por citometría de flujo de la línea celular de hLIGHT-EL4 para confirmar la identificación de anticuerpos que se unen de forma inmuno-específica a la forma nativa de hLIGHT.

Los hibridomas positivos se sometieron a ensayo para la actividad antagonista mediante la clasificación de la capacidad de los anticuerpos producidos por el hibridoma para bloquear HVEM:Fc y LTβR:Fc de unión a células hLIGHT-EL4. Esta actividad de bloqueo se normalizó a la concentración anticuerpo determinada por ELISA de IgG humana. Los 15 mejores candidatos se clonaron por dilución limitante para producir hibridomas monoclonales, mientras que el resto se congeló. Se produjeron purificaciones a pequeña escala a partir de cultivos de extinción (< 1 mg) para estos 15 anticuerpos para caracterización adicional y clasificación basándose en los siguientes criterios: afinidad de unión relativa para hLIGHT, la capacidad para bloquear HVEM:Fc y LTβR:Fc humano de unión a células hLIGHT-EL4, bloqueo cruzado entre sí, y la capacidad para bloquear la secreción de quimioquinas mediada por hLIGHT soluble y expresada en la superficie celular a partir de la línea celular epitelial del colon HT29.14s. Basándose en estos estudios, las propiedades de los 5 mejores candidatos seleccionados (E1, E13, E63, F23 y F19) se presentan en la Figura 3.

Anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT E1, E13, E63, F23 y F19 cada uno unido específicamente a la línea activada de linfocitos T humanos (II23.D7) y al hLIGHT estable que expresa la línea celular hLIGHT-EL4, pero no a células precursoras EL4 o II23.D7 de reposo (Figura 1A). La unión de estos anticuerpos anti-hLIGHT humanos alcanzaron la saturación (Figura 1B). La afinidad de unión funcional en el estado estacionario de cada anticuerpo se determinó por valoración de la cantidad de anticuerpo necesario para marcar células hLIGHT-EL4 (FIGS. 2A y 2B). El análisis de regresión no lineal se realizó para determinar la medida de la afinidad de unión funcional o CE50 para cada candidato (Figura 3). Se observó un intervalo de afinidades funcionales. Tanto una CE50 baja como un alto nivel de tinción (intensidad media de fluorescencia (MFI)) en la saturación se consideraron ideales durante el proceso de clasificación y selección.

Los anticuerpos se sometieron a ensayo por ELISA para determinar si competían entre sí por la unión a hLIGHT soluble (Figura 4). En este análisis se identificaron dos grupos de epítomos de hLIGHT. Los "anticuerpos E" (E1, E13, y E63) producían un bloqueo cruzado entre sí, y los "anticuerpos F" (F19 y F23) producían un bloqueo cruzado entre sí. Sin embargo, los "anticuerpos E" no eran capaces de producir un bloqueo cruzado con los "anticuerpos F" y *viceversa*. Tal como se esperaba, todos los anticuerpos se bloqueaban a sí mismos en este ensayo.

La capacidad de E1, E13, E63, F23 y F19 para bloquear las proteínas de fusión humanas HVEM:Fc y LT β R:Fc a hLIGHT expresado en la superficie celular usando un ensayo basado en citometría de flujo se muestra en las FIGS. 5A y 5B, y en las FIGS. 6A y 6B respectivamente. En estos experimentos, cantidades graduadas de cada anticuerpo se añadieron a la línea celular de EL4-hLIGHT seguido de la adición de una cantidad de subsaturación de la proteína de fusión del receptor. Las proteínas de fusión del receptor se detectaron por anticuerpos anti-His para LT β R:Fc marcado con His o estreptavidina-PE para HVEM:Fc biotinilado. Tal como se muestra, cada uno de los anticuerpos bloqueaba a cada proteína de fusión del receptor a partir de la unión a hLIGHT, en contraste con el anticuerpo de control M2 anti-influenza totalmente humano que no tenía efecto sobre la unión del receptor de Fc. En cada experimento, todos los anticuerpos bloqueaban la unión al receptor de una manera dependiente de la dosis que permitía el análisis por regresión no lineal para determinar la dosis de CI₅₀ (Figura 3). Estos valores se tuvieron en cuenta en la clasificación de los candidatos potenciales.

Para probar directamente que los anticuerpos antagonistas de la invención bloqueaban la señalización mediada por hLIGHT, se establece un ensayo para medir la señalización *in vitro* mediada por hLIGHT. Para este fin, la línea celular epitelial de colon HT29.14s, que expresa tanto LT β R como HVEM, se trató con cantidades graduadas de hLIGHT soluble y los medios de crecimiento se analizaron para la presencia de citoquinas secretadas durante un periodo de tiempo de varios días. Usando ELISA convencionales y análisis múltiple de matriz en suspensión, se determinó que hLIGHT induce CCL20, IL-8 y RANTES de una manera dependiente de la dosis (Figura 7 y Figuras 8A y 8B). La Figura 7 representa una valoración de dosis de hLIGHT soluble recogido en el día 3. Se usó TNF recombinante como un control positivo para la inducción de quimioquinas a través de los receptores de TNF, mientras que se usó linfotoxina (LT $\alpha_1\beta_2$) como control positivo para la señalización a través del LT β R. Se usó fosfatasa alcalina bacteriana marcada con FLAG (FLAG-BAP) como un control negativo de proteínas irrelevantes marcadas. Tal como se esperaba, los niveles de quimioquinas producidos por el contacto de las células con hLIGHT fue equivalente a los inducidos por LT $\alpha\beta$, mientras que TNF fue más eficaz en la inducción de CCL20 y IL-8, pero indujo niveles similares de RANTES. Este ensayo de respuesta celular se usa para medir la señalización de hLIGHT y evaluar la capacidad de los anticuerpos de la presente divulgación para bloquear los sucesos de señalización mediados por hLIGHT *in vitro*.

En el ensayo de inducción de CCL20 a partir de HT29.14s mediado por hLIGHT, cantidades graduadas de los anticuerpos anti-hLIGHT se incubaron previamente con una cantidad constante de hLIGHT soluble recombinante, y a continuación se añadió a las células HT29.14s (Figura 9). Los niveles de quimioquinas se sometieron a ensayo en el día 3 o 4 después del tratamiento y se compararon con los niveles inducidos por hLIGHT soluble solo o hLIGHT soluble incubado previamente con una cantidad irrelevante de proteína M2 antiinfluenza totalmente humana como un control de isotipos. En estos ensayos, los anticuerpos de la invención sometidos a ensayo en el presente documento bloquearon la inducción de CCL20 mediada por hLIGHT soluble de una manera dependiente de la dosis. En algunos casos, el análisis de regresión no lineal fue capaz de producir valores de CI₅₀.

Sin desear quedar ligado a ningún mecanismo o teoría en particular, se cree que la señalización iniciada mediante la unión de hLIGHT de la superficie celular a sus receptores afines en otras células puede ser crítica para ejercer la actividad coestimuladora de linfocitos T observada a través de interacciones de HVEM o producción de quimioquinas aumentada a través de LT β R expresado en células de origen en el estroma o epitelial en el intestino, bazo o ganglios linfáticos. La inducción de CCL20 en el intestino parece que se regula más mediante la expresión de ligandos LT β R en las células que se ponen en contacto con células epiteliales que mediante factores solubles (Rumbo y col. 2004 Gastroenterology 127 213-23). Por lo tanto, se desarrolló un ensayo de señalización de hLIGHT en la superficie celular para evaluar la capacidad de nuestros anticuerpos para bloquear hLIGHT en la superficie celular. En este ensayo, células hLIGHT-EL4 fijadas con formalina se usaron para inducir quimioquinas mediante su incubación con células HT29.14s de manera similar al ensayo de hLIGHT soluble. Estas células indujeron CCL20 y RANTES a niveles equivalentes a hLIGHT soluble. Cuando se incubaron previamente cantidades graduadas de anticuerpos anti-hLIGHT con células hLIGHT-EL4 fijadas, la inducción de RANTES se bloqueó a niveles observados cuando no se añadieron células que expresaban hLIGHT (Figura 10). En experimentos idénticos, CCL20 se inhibió del mismo modo. Tomados en conjunto, estos datos indican que los anticuerpos de la presente divulgación pueden bloquear la señalización de hLIGHT tanto soluble, unido a la membrana *in vitro*.

Ejemplo 2 - Caracterización de anticuerpos monoclonales anti-humanos de ratón disponibles en el mercado

Bloqueo cruzado de anticuerpos. Se realizaron experimentos de bloqueo cruzado tal como se describe en el Ejemplo 1 usando anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT de ratón disponibles en R&D Systems ("mAb de ratón de R&D") y Abnova ("mAb de ratón de Abnova"), así como los anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT humanos identificados en el Ejemplo 1, para evaluar cuál es el epítomo de hLIGHT al que se unen los anticuerpos. Los resultados se presentan

en la Figura 11.

Los resultados muestran que el mAb de ratón de R&D se une al mismo epítipo que los anticuerpos monoclonales E1, E13, y E63 humanos ("anticuerpos E humanos"), así como al mismo epítipo que los anticuerpos monoclonales F19 y F23 humanos ("anticuerpos F humanos"). Por lo tanto, en contraste con los anticuerpos monoclonales E y F anti-hLIGHT humanos identificados en el Ejemplo 1, que se encontró que se unían de forma inmuno-específica solamente a uno de dos epítipos distintos, los mAb de ratón de R&D se unen a ambos grupos de epítipos de hLIGHT. Es decir, los anticuerpos E humanos y los anticuerpos F humanos identificados en el Ejemplo 1 no se bloqueaban en cruzado entre sí. Los anticuerpos E humanos bloqueaban en cruzado otros anticuerpos E humanos, y los anticuerpos F humanos bloqueaban en cruzado otros anticuerpos F humanos; mientras que todos los anticuerpos E humanos y los anticuerpos F humanos fueron capaces de bloquear en cruzado el mAb de ratón de R&D. De forma análoga, el mAb de ratón de R&D bloqueó en cruzado los anticuerpos E humanos así como los anticuerpos F humanos.

Los resultados también muestran que el mAb de ratón de Abnova no se une a cada epítipo que está unido mediante los anticuerpos E humanos y los anticuerpos F humanos. Es decir, el mAb de ratón de Abnova no se bloqueó en cruzado por ninguno de los anticuerpos E1, E13, E63, F19 o F23 humanos, ni el mAb de ratón de Abnova fue capaz de bloquear en cruzado ninguno de los anticuerpos E1, E13, E63, F19 o F23 humanos.

Actividad de bloqueo de anticuerpos para la unión de HVEM:Fc a células 293 que expresan hLIGHT. Anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT humanos E1, E13 y F19, los mAb de ratón de R&D, anticuerpos policlonales anti-hLIGHT de cabra disponibles en el mercado (R&D Systems), y anticuerpos policlonales anti-hLIGHT de conejo (eBioscience) se sometieron ensayo por su capacidad para bloquear la unión de HVEM:Fc a células 293 que expresaban hLIGHT tal como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 12 y en la Figura 14B. Todos los cuatro anticuerpos monoclonales fueron capaces de inhibir la unión de una manera dependiente de la dosis, tal como se determina por análisis de FACS. Los anticuerpos policlonales de cabra de R&D también fueron capaces de inhibir la unión del HVEM:Fc, mientras que el anticuerpo policlonal de conejo de eBioscience no lo fue.

Actividad de bloqueo de anticuerpos para la unión de LT β R:Fc a células 293 que expresan hLIGHT. Anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT humanos E1 y E13, los mAb de ratón de R&D, anticuerpos policlonales anti-hLIGHT de cabra disponibles en el mercado (R&D Systems), y anticuerpos policlonales anti-hLIGHT de conejo (eBioscience) se sometieron ensayo por su capacidad para bloquear la unión de LT β R:Fc a células 293 que expresaban hLIGHT tal como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Figura 13 y en la Figura 14B. Todos los cuatro anticuerpos monoclonales fueron capaces de inhibir la unión de una manera dependiente de la dosis, tal como se determina por análisis de FACS. Los anticuerpos policlonales de cabra de R&D también fueron capaces de inhibir la unión del LT β R:Fc, mientras que el anticuerpo policlonal de conejo de eBioscience no lo fue.

Unión a hLIGHT nativo y desnaturalizado. Cinco microgramos de LIGHT humano soluble se cocció en 2 x de tampón de muestra SDS (desnaturalizado) o sin tratar (nativo), y a continuación ambos se diluyeron en serie en incrementos de 6x. 5 μ l de cada dilución de hLIGHT se aplicaron puntualmente de forma simultánea sobre membranas de PVDF de 0,2 μ m (Invitrogen, Carlsbad, CA) usando una pipeta multicanal de 8 puntas. Se permitió que las manchas de transferencia se secaran al aire y después se volvieron a hidratar, se bloquearon (1 x TBST (Tween-20 salino tamponado con Tris) + leche desnatada al 2,5 % + azida sódica al 0,02 %). Cada transferencia se sondeó con 5 μ g/ml de cada anticuerpo primario (véase a continuación). Las manchas de transferencia se lavaron 3x en 1 x TBST seguido de Abs secundario biotinilado (α Humano de Biotina-Cabra (Vector Labs, Burlingame, CA), α ratón de Biotina-Cabra (Jackson labs, Bar Harbor, ME), α cabra de Biotina-Ratón (Sigma-Aldrich corp., St. Louis, MO)) a 5 μ g/ml. Las manchas de transferencia se lavaron 3x en 1 x TBST seguido de super SA-HRP (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Se usó quimioluminiscencia para la detección usando el kit de detección de ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) y la señal se visualizó por exposición a película de formación de imágenes de AR con X-OMAT (Kodak, Rochester, Nueva York)

Los anticuerpos primarios sometidos a ensayo fueron los mAb anti-hLIGHT humanos E1, E13, E63, F19, F23 (véase el Ejemplo 1), anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT de murino disponibles en el mercado de R&D Systems ("mAb de ratón de R&D") y Abnova ("mAb de ratón de Abnova"), una preparación de anticuerpo policlonal anti-hLIGHT de cabra (R&D Systems "pAb de cabra de R&D") y dos preparaciones de anticuerpo policlonal anti-hLIGHT de conejo (eBioscience ("pAb de conejo de eBioscience") y Peprotech ("pAb de conejo de Peprotech")).

Los resultados se muestran en la Figura 15 y en la Figura 16. Los "anticuerpos E" monoclonales anti-hLIGHT humanos de la presente divulgación (E1, E13 y E63) sometidos a ensayo en este ensayo se unen de forma inmuno-específica a las formas tanto nativa como desnaturalizada de hLIGHT soluble (Figura 15A y Figura 16). El anticuerpo E63 se une de forma inmuno-específica a concentraciones más bajas de hLIGHT nativo (el límite de detección más bajo es de 3,9 ng para hLIGHT nativo) que el hLIGHT desnaturalizado (el límite de detección más bajo es de 139 ng para hLIGHT desnaturalizado). El anticuerpo E1 también se une de forma inmuno-específica a concentraciones más bajas de hLIGHT nativo (el límite de detección más bajo es de 23 ng para hLIGHT nativo) en comparación con el hLIGHT desnaturalizado (el límite de detección más bajo es de 139 ng para hLIGHT

desnaturalizado). El anticuerpo E13 se une de forma inespecífica a las formas tanto nativa como desnaturalizada de hLIGHT con el límite de detección más bajo de 0,64 ng para ambas formas de hLIGHT.

5 En contraste con los "anticuerpos E" monoclonales anti-hLIGHT humanos, los "anticuerpos F" monoclonales anti-hLIGHT humanos de la presente divulgación (F19 y F23) sometidos a ensayo en este ensayo se unen de forma inespecífica a la forma nativa de hLIGHT soluble (el límite de detección más bajo es de 23 ng para hLIGHT nativo), pero no la forma desnaturalizada, incluso a las concentraciones más elevadas (> 5000 ng) de hLIGHT desnaturalizado (Figura 15A y Figura 16).

10 Cada uno de los anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT de ratón disponibles en el mercado (mAb de ratón de R&D y MAb de ratón de Abnova) sometidos a ensayo en este ensayo se unen de forma inespecífica a las formas tanto nativa como desnaturalizada de hLIGHT soluble. El MAb de ratón de R&D se une de forma inespecífica a concentraciones más bajas de hLIGHT nativo (el límite de detección más bajo es de 23 ng para hLIGHT nativo) en comparación con hLIGHT desnaturalizado (el límite de detección más bajo es de 139 ng para hLIGHT desnaturalizado). El MAb de ratón de Abnova se une de forma inespecífica a aproximadamente
15 concentraciones iguales de las formas tanto nativa como desnaturalizada de hLIGHT soluble (el límite de detección más bajo es de 0,64 ng para hLIGHT nativo o desnaturalizado nativo, respectivamente).

20 Cada una de las tres preparaciones de anticuerpo policlonal anti-hLIGHT disponibles en el mercado (PAb de cabra de R&D, pAb de conejo de eBioscience, y PAb de conejo de Peprotech) se unían a las formas tanto nativa como desnaturalizada de hLIGHT soluble. El PAb de cabra de R&D se une de forma inespecífica a concentraciones ligeramente más bajas de hLIGHT nativo (el límite de detección más bajo es de 0,04 ng para hLIGHT nativo) en comparación con hLIGHT desnaturalizado (el límite de detección más bajo es de 0,13 ng de hLIGHT desnaturalizado). El pAb de conejo de eBioscience también se une de forma inespecífica a concentraciones
25 ligeramente más bajas de hLIGHT nativo (el límite de detección más bajo es de 0,4 ng para hLIGHT nativo) en comparación con hLIGHT desnaturalizado (el límite de detección más bajo es de 1,2 ng para hLIGHT desnaturalizado). De forma análoga, el PAb de conejo de Peprotech también se une de forma inespecífica a concentraciones ligeramente más bajas de hLIGHT nativo (el límite de detección más bajo es de 0,04 ng para hLIGHT nativo) en comparación con hLIGHT desnaturalizado (el límite de detección más bajo es de 0,13 ng para
30 hLIGHT desnaturalizado).

Inhibición de la actividad biológica de células que expresan un receptor de hLIGHT. También se realizaron experimentos tal como se describe en el Ejemplo 1 para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT de ratón disponibles en el mercado eran capaces de bloquear de forma competitiva el hLIGHT soluble a partir de la
35 unión a LTβR y HVEM expresados en la superficie celular en células HT29.14s. Los resultados se presentan en la Figura 17 (CCL20) y en la Figura 18 (RANTES), y muestran ni el MAb de ratón de R&D ni el MAb de ratón de Abnova fueron capaces de inhibir la producción de quimioquinas de CCL20 o RANTES mediada por LIGHT por estas células, mientras que los human mAb E13 y F23 humano fueron capaces de reducir la secreción de quimioquinas a niveles de fondo.

40 Ejemplo 3 - Caracterización de cadenas Kappa de anticuerpos anti-hLIGHT humanos F19 y E1

Los procedimientos analizados en el Ejemplo 1 se usaron para encontrar una pareja de cadena kappa-cadena pesada preferente de los anticuerpos producidos por los hibridomas E1 y F19. Basándose en los resultados de estos
45 experimentos, se muestra que E1 kappa(B) (SEC ID N°: 6) es la cadena ligera kappa preferente de los anticuerpos hLIGHT producidos por el hibridoma E1, y F19kappa(B) (SEC ID N°: 9) es la cadena ligera kappa preferente de los anticuerpos hLIGHT producidos por el hibridoma F19.

Anticuerpos recombinantes de una sola cadena se generaron por transfección transitoria de vectores de expresión en mamíferos que contenían los genes de la cadena pesada emparejados con cada uno de los genes de la cadena
50 kappa individual que existían en las células del hibridoma precursor. Este material se sometió a ensayo a continuación en paralelo con los anticuerpos purificados generados a partir de los respectivos hibridomas precursores.

55 Se realizaron ensayos de unión anticuerpos tal como se describe en el Ejemplo 1. La pareja cadena kappa-cadena pesada que comprende las líneas celulares transfectadas de forma estable de hLIGHT teñidas de forma específica de E1 kappa(B) o F19kappa(B), (HEK 293-hLIGHT) hasta un grado equivalente en comparación con los anticuerpos respectivos producidos por el hibridoma precursor (Figura 19).

60 Se realizaron experimentos de bloqueo cruzado con ELISA tal como se indica en el Ejemplo 1, y los resultados indicaron que estos anticuerpos recombinantes reconocen los mismos epítomos sobre hLIGHT al igual que sus Ab del hibridoma precursor (Figura 20).

Los anticuerpos recombinantes de una sola cadena kappa se sometieron a ensayo adicionalmente tal como se describe en el Ejemplo 1 por su capacidad para bloquear la unión de hLIGHT expresaron la superficie celular a
65 formas de fusión receptor-Fc soluble tanto de HVEM humano como del LTβR (Figura 21). Los niveles de bloqueo no

eran idénticos a los Ab precursores.

Finalmente, los anticuerpos recombinantes de una sola cadena kappa se sometieron a ensayo por su capacidad para inhibir la secreción de CCL20 mediada por LIGHT a partir de células epiteliales del colon HT29 tal como se describe en los Ejemplos 1 y 2 (Figura 22 y Figura 23). En estos experimentos, la incubación de hLIGHT soluble con anticuerpos anti-hLIGHT bloquea la secreción mediada por hLIGHT de CCL20 a partir de células HT29.14s de forma similar a la de los hibridomas precursores.

Además, las recombinantes de la cadena kappa individual que también mantienen la especificidad del hibridoma precursor produjeron anticuerpos en la evaluación de transferencia de mancha de LIGHT nativo frente a la desnaturizado (los datos no se muestran).

En conjunto, estos resultados indican que la E1kappa (B) (SEC ID N°: 6) es la cadena ligera kappa preferente para su uso en combinación con la cadena pesada E1 (SEC ID N°: 1), y la F19kappa (B) (SEC ID N°: 9) es la cadena ligera kappa preferente para su uso en combinación con la cadena pesada F19 (SEC ID N°: 4).

Ejemplo 4 - Unión de anticuerpos y bloqueo mediado por anticuerpos de la unión de HVEM:Fc y LTβR:Fc a variantes de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) de LIGHT

Al menos dos variantes de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) no sinónimas existen para LIGHT humano (Figura 24). Una variante de SNP codifica un ácido glutámico (E) o una lisina (K) en la posición 214 del aminoácido, y la otra variante de SNP codifica una serina (S) o una leucina (L) en la posición 32 del aminoácido. Tal como se muestra en las Figuras 24A-24B, la frecuencia alélica de cada variante de SNP a través de diversas poblaciones étnicas varía. Por lo tanto, los anticuerpos hLIGHT que se unen a una variante dada de SNP pueden ser más eficaces en el tratamiento o la prevención de una enfermedad mediada por hLIGHT, o síntoma de la misma en las poblaciones étnicas que tienen una mayor incidencia de la variante dada de SNP.

En este ejemplo, los anticuerpos hLIGHT se proporciona en el presente documento mostraron la unión a variantes de SNP no sinónimas de hLIGHT que están presentes en los dominios extracelulares y citoplasmáticos de hLIGHT. La unión de estos anticuerpos a variantes de SNP también se correlacionaron con la capacidad del anticuerpo para bloquear de manera eficaz HVEM:Fc y LTβR:Fc a la variante de SNP de hLIGHT, y también bloquean de forma eficaz la actividad biológica de células que expresan un receptor de hLIGHT.

Unión a anticuerpos. Valoraciones de dosis de anticuerpos de F23 y E1 kappa(B) se realizaron tal como en el Ejemplo 1 para determinar si estos anticuerpos se unen a las variantes de SNP de hLIGHT expresado en la superficie celular. En estos experimentos se usó una línea celular de EL4, que se preparó básicamente tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, y expresaron la respectiva variante de SNP de hLIGHT de forma estable en la superficie. Tal como se muestra en las Figuras 25A y 25C, respectivamente, cada uno de los anticuerpos F23 y E1 kappa(B) se unieron a las variantes tanto 214E-32S como 214E-32L de SNP. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 25B, sólo el anticuerpo F23, y no el E1kappa(B), reconocieron la variante 214K-32S de SNP.

Los anticuerpos F23 (una IgG1), F19, E63 y E1kappa(B) también se sometieron a ensayo para determinar si existía alguna diferencia entre la capacidad de los "anticuerpos F" y los "anticuerpos E" para reconocer cada forma de variante de SNP. Tal como se muestra en las Figuras 26A y 26B, los anticuerpos F23 y F19 se unen a las formas de SNP tanto 214E como 214K de hLIGHT. Sin embargo, los anticuerpos E63 y E1kappa(B) se unen solamente a la forma predominante de LIGHT 214E, y no a 214K (Figuras 26A y 26B).

Actividad de bloqueo de anticuerpos para la unión de HVEM:Fc y LTβR:Fc a la variante de SNP 214K-32S de LIGHT. Dado que el anticuerpo F23 se unió tanto a la forma predominante (214E) como a la forma menos predominante (214K) de variantes de LIGHT, se determinó a continuación si el anticuerpo F23 podía bloquear la unión a HVEM:Fc o a LTβR:Fc. El bloqueo mediado por anticuerpos de las proteínas de fusión del receptor se realizó tal como en el Ejemplo 1. En resumen, la línea celular EL4-214K-32S se incubó con cantidades crecientes de anticuerpos anti-LIGHT seguido de la adición de HVEM:Fc o LTβR:Fc. Los efectos de esta incubación previa en la unión al receptor se evaluó mediante la detección de HVEM:Fc o LTβR:Fc tal como en el Ejemplo 1. Tal como se muestra en la Figura 25D, el anticuerpo F23 bloqueó de forma eficaz la unión tanto de HVEM:Fc como de LTβR:Fc a la variante 214K-32S de LIGHT.

Inhibición de la actividad biológica mediada por variantes de SNP de LIGHT en la superficie celular de células que expresan un receptor de LIGHT. Este estudio se realizó para determinar si anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT humanos que se ha mostrado anteriormente que se unen a las variantes de SNP de hLIGHT tanto 214K como 214E también eran capaces de bloquear de forma eficaz la secreción de RANTES en células epiteliales de colon humano, HT29.14s, que expresan tanto LTβR como HVEM, mediante la variante de SNP 214E o 214K de hLIGHT expresado en la superficie celular, o variantes de SNP de hLIGHT soluble de las mismas. En el ensayo de inducción de RANTES en HT29.14s mediado por LIGHT expresado en la superficie celular, cantidades graduadas de anticuerpos anti-hLIGHT se incubaron previamente con un número constante de células que expresan las variantes de SNP de

hLIGHT (214K o 214E). Los niveles de quimioquinas se sometieron a ensayo en el día 3 después del tratamiento y se compararon con los niveles inducidos solo por hLIGHT soluble, células que expresaban solo hLIGHT o células incubadas previamente con una IgG humana irrelevante una proteína de control de isotipos.

5 En estos ensayos, los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento (F19 y F23) bloquearon la inducción de RANTES mediada por hLIGHT soluble y ambas variantes de SNP de hLIGHT expresadas en la superficie celular (214E o 214K) de una manera dependiente de la dosis. El anticuerpo monoclonal anti-hLIGHT de ratón disponible en el mercado disponible en R&D systems (el mAb de ratón de R&D, tal como en el Ejemplo 1) no fue capaz de bloquear la secreción de quimioquina soluble o mediada por hLIGHT expresado en la superficie celular,
10 independientemente de la variante de SNP. Tanto las variantes de hLIGHT expresadas en la superficie celular como los controles positivos de hLIGHT recombinante soluble indujeron niveles equivalentes de RANTES, y la incubación previa del isotipo hIgG de control negativo con las variantes de hLIGHT expresadas en la superficie celular o hLIGHT recombinante soluble no redujeron equitativamente los niveles de RANTES.

15 Análisis. De los más de treinta polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP) en el locus genómico de hLIGHT, al menos existen dos hLIGHT no sinónimos con datos de frecuencia asociados con ellos (Figura 24). Uno codifica un ácido glutámico (~0,9) o una lisina (0,1) en la posición 214 del aminoácido de hLIGHT y reside en la región extracelular de hLIGHT. El otro codifica una serina (0,99) o una leucina (0,011) en la posición 32 del aminoácido 32 y reside en la región citoplasmática de hLIGHT. El locus genómico de hLIGHT reside en una región cromosómica,
20 ch19p13.3, que tiene contenidos de un locus de susceptibilidad para la enfermedad inflamatoria del intestino (Rioux y col. (2000) Am J Hum Genet. 66: 1863- 70), y de este modo sugiere que un SNP puede ser una correlación de la frecuencia de la enfermedad de IBD. Por lo tanto, fue de interés determinar si los antagonistas anti-hLIGHT que se proporcionan en el presente documento eran capaces de reconocer variantes de SNP no sinónimas de hLIGHT.

25 En este ejemplo, se somete a ensayo la capacidad de los anticuerpos anti-hLIGHT para unirse a variantes de SNP de hLIGHT expresadas de forma estable en la superficie de las líneas celulares EL4. Tal como se muestra en las Figuras 25A y 25B, F23 se une a las variantes de SNP tanto 214E como 214K, mientras que E1kappa(B) solamente se une a la forma predominante 214E. F23 bloquea del mismo modo la unión de HVEM:Fc o LTβR:Fc a estas células (Figura 25D). Tal como se esperaba, el SNP citoplasmático no parece afectar a la unión de cualquier anticuerpo (Figura 25C). Cuando se sometieron a ensayo los "anticuerpos E" y los "anticuerpos F", solamente los anticuerpos F fueron capaces de unirse a las variantes tanto 214K como 214E de SNP (Figuras 26A y 26B). El anticuerpo comercial de MAb de ratón de R&D también estaba disponible para unirse a ambas variantes de SNP (los datos no se muestran).

35 Además del bloqueo de anticuerpos anti-hLIGHT de versiones solubles de los receptores a las variantes de SNP de hLIGHT *in vitro*, la inducción de quimioquinas mediada por SNP de hLIGHT en la superficie celular también se inhibió mediante anticuerpos anti-hLIGHT de la presente divulgación. En este ensayo, líneas celulares EL4 que expresan variantes de SNP de hLIGHT 214E o 214K se fijaron con formalina y se usaron para tratar la línea celular epitelial del colon HT29. Tal como se muestra en la Figura 27, estas líneas celulares solas indujeron niveles similares de
40 RANTES en comparación con 1 µg de LIGHT soluble. "Anticuerpos F" anti-hLIGHT se sometieron a ensayo por incubación previa de las líneas celulares que expresaban hLIGHT con cantidades graduadas de anticuerpo y se compararon con controles de isotipos o con el mAb de ratón de R&D disponible en el mercado. Tanto F23 como F19kappa(B) inhibieron la secreción de RANTES mediada por cualquier variante de SNP que expresaba la línea celular. Sin embargo, el MAb de ratón de R&D y el control negativo de isotipo humano no inhibió la secreción de
45 RANTES por cualquier variante de SNP de LIGHT. Esto se produjo a pesar del hecho de que el MAb de ratón de R&D fue capaz de unirse a ambas variantes de SNP. Estos resultados no solo demuestran que los anticuerpos F23 y F19kappa(B) de la presente divulgación bloquean cualquier señalización mediante la variante de SNP de LIGHT, sino que también presentan superioridad con respecto al mAb de ratón de R&D comercial.

50 Ejemplo 5 - Estudio de eficacia in vivo de 124F23 en el modelo de enfermedad aguda de injerto xenogénico frente a huésped

En este ejemplo, la eficacia *in vivo* de un anticuerpo anti-hLIGHT proporcionado en el presente documento se evaluó en un modelo de murino de enfermedad aguda de injerto xenogénico frente a huésped (GVHD). En este modelo se
55 mostró que el anticuerpo F23 disminuía la patología macroscópica general (diarrea, inflamación peritoneal y ascitis, e inflamación intestinal) y la histopatología (gravedad de la inflamación, extensión de la inflamación, daño/atrofia de las vellosidades, y porcentaje de implicación), así como una disminución en el número de linfocitos T en el bazo.

Purificación de PBMC humano a partir de sangre entera: Se recogió sangre entera a partir de donantes sanos entre las edades de 18 y 50 mediante el programa de donación de sangre normal en el Hospital Scripps Green (La Jolla, CA), y se añadió heparina para prevenir la coagulación. No se especificó la raza, etnia, o género. La sangre se diluyó en PBS y a continuación se reforzó con FICOLL-PLAQUE Plus (Amersham Biosciences). Las células mononucleares se separaron del suero y de las plaquetas por centrifugación a 1800 RPM sin el freno. La superficie de contacto que contenía el PBMC se recogió a continuación y se lavó dos veces con PBS.
65

Modelo *in vivo* de enfermedad aguda de injerto frente a huésped: Se usó un modelo de enfermedad aguda de injerto xenogénico frente a huésped para someter a ensayo el potencial terapéutico del anticuerpo LIGHT anti-humano F23 (124F23G1) *in vivo* (Watanabe y col. 2006 1006, Clin Immunol. 120 247-59), básicamente tal como se describe en la Figura 28. En resumen, ratones macho inmunodeficientes combinados (SCID) de entre 5-10 semanas de edad se inyectaron en el día - 2 con 20 µg de anticuerpo de cadena beta del receptor IL2 anti-ratón (IL2Rβ) (TMβ1, Tanaka y col. 1993 J Exp Med. 178 1103) para disminuir linfocitos citolíticos naturales endógenos de murino. Al día siguiente (día - 1), los ratones recibieron 2,5 Gy de radiación subletal usando una fuente de cesio para permitir la migración de las células humanas al tracto intestinal. Al día siguiente (día 0) los ratones recibieron un total de 10 millones de células mononucleares de sangre periférica humana en PBS por inyección intraperitoneal seguido inmediatamente de inyección intravenosa de anticuerpos LIGHT anti-humano humano (124F23G1) o hFgG1 de control negativo (anti-dinitrofenol (anti-DNP), Kirin Brewery Co. Ltd.) a una dosis de 100 µg en 100 µl de PBS. Los linfocitos T humanos se expanden e inducen una enfermedad de tipo injerto frente a huésped y síntomas de la misma, dando como resultado, por ejemplo, pérdida de peso, hematuria, hidroperitoneo, infiltrados de células inflamatorias en el hígado y en el tracto intestinal, y finalmente la muerte. La enfermedad está mediada principalmente por linfocitos T humanos ya que la transferencia de linfocitos T solos induce síntomas similares. El peso corporal se determinó cada 3-4 días y los ratones recibieron el anticuerpo anti-IL2Rβ semanalmente. En el día 12 los ratones fueron sacrificados y se analizó la patología general y los síntomas de la enfermedad, los bazo se recogieron para análisis por citometría de flujo y los ciegos para histología, y se recogió suero para el análisis de citoquinas humanas y anticuerpos (Watanabe y col. 1006, Clin Immunol. 120 247-59).

Análisis funcional *in vivo* de anticuerpos monoclonales LIGHT anti-humano humano. La patología general observada en el día 12 se puntuó como sigue a continuación: diarrea (0 o 1), hemorragia en el intestino y en la cavidad peritoneal, y peritonitis (cada uno clasificado 0, 1, 2 o 3 como ninguno, leve, moderado, o grave, respectivamente). La suma de todos los síntomas de la enfermedad se usó para determinar la puntuación total de la patología general. Tal como se muestra en la Figura 29, todos los ratones que recibieron el anticuerpo de control o los PBMC solos (sin inyección de anticuerpos) presentaron síntomas de GVHD, con puntuaciones de patología más elevadas que los ratones que recibieron anticuerpo anti-LIGHT 124F23G1.

El análisis histopatológico se realizó en secciones de H y E del ciego y puntuaron como sigue a continuación: gravedad de la inflamación, extensión de la inflamación, daño/atrofia de las vellosidades y porcentaje de implicación (cada uno clasificado 0, 1, 2 o 3 como ninguno, leve, moderado, o grave, respectivamente). La puntuación final fue una suma de cada categoría, con una puntuación máxima de 12 para cada ratón. Tal como se muestra en la Figura 30, los ratones que recibieron el anticuerpo de control o los PBMC solos (sin inyección de anticuerpos) presentaron histopatología similar, mientras que los ratones inyectados con 124F23G1 no presentaron signos histopatológicos de enfermedad. Un ejemplo de la histología del ciego observada en los animales tratados con anti-LIGHT se ilustra en la Figura 31A, que muestra una estructura uniforme de las vellosidades, capa de submucosa y de músculo, así como una ascitis o sangre. En contraste, la histología del ciego a partir de animales tratados con anticuerpo de control tiene características importantes de la enfermedad, que incluyen submucosa llena de ascitis, signos de sangrado intestinal indicados por grupos de eritrocitos e infiltrados importantes de linfocitos (Figura 31B).

Los análisis de los bazo estaban de acuerdo con la patología y la histopatología general. Los linfocitos T humanos estaban presentes en los bazo de los ratones tratados con los anticuerpos de control, pero el número de linfocitos T humanos en animales tratados con 124F23G1 fue significativamente menor que el número de linfocitos T en los animales de control (Figura 32).

En estudios de seguimiento, las versiones tanto de disminución (IgG1) y/o de no disminución de (IgG4PE) linfocitos T de los anticuerpos anti-hLIGHT se pueden usar para evaluar el mecanismo de mejora de la enfermedad, tal como si los linfocitos T están siendo bloqueados por el anticuerpo o si en su lugar están experimentando apoptosis.

Análisis: La enfermedad aguda de injerto frente a huésped (GVHD) es una complicación importante asociada con el trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas. La GVHD se define generalmente como el ataque amplio frente a tejidos huésped por los linfocitos T dadores. Después del trasplante, la inmunosupresión sistémica es el método actual para prevenir la GVHD, sin embargo esto puede conducir a infecciones por patógenos oportunistas y a una recaída de la leucemia. Por lo tanto, el bloqueo de las señales coestimuladoras de linfocitos T es una de las alternativas más prometedoras a los inmunosupresores. Informes recientes indican que la coestimulación de LIGHT-HVEM de linfocitos T desempeña un papel patogénico crítico en la GVHD (Xu y col. (2007) 109:4097-4104). Por lo tanto, los anticuerpos anti-LIGHT antagonistas pueden tener eficacia terapéutica para la GVHD. La eficacia *in vivo* demostrada en el modelo de GVHD xenogénico agudo demuestra este potencial.

Un modelo xenogénico agudo de la GVHD es en el que PBMC humanos se inyectan en ratones SCID irradiados de forma subletal con disminución de células NK (Figura 28). En este modelo, la radiación inicia el daño intestinal y los linfocitos T median la inflamación intestinal de la enfermedad. Los animales mostraron graves signos de enfermedad en aproximadamente 12 días después de la inyección de PBMC. Las características de la enfermedad incluyen inflamación intestinal que se manifiesta por hemorragia, ascitis y atrofia de las vellosidades. En un estudio inicial, el tratamiento de ratones con 100 microgramos de anticuerpo anti-LIGHT (124F23G1) redujo la patología total observada en el intestino (Figura 29). De forma análoga esta reducción se corroboró mediante un análisis más

refinado mediante la histopatología del ciego, en la que el tratamiento con anticuerpo anti-LIGHT no condujo a enfermedad detectable (Figura 30). La Figura 31 A muestra la sección representativa del ciego teñida con H y E a partir de un animal tratado con anti-LIGHT. En contraste, el ciego de un animal tratado con anticuerpo de control presenta características de una grave inflamación del intestino, que incluye parches rojos de células que indican hemorragia, la submucosa rellena con fluido extremadamente implicado complejo, e infiltrados de linfocitos (Figura 31B). En este modelo, los linfocitos T humanos transferidos son principalmente responsables de la inducción de la enfermedad y los números de linfocitos T esplénicos tienden a correlacionarse con la gravedad de la enfermedad. El tratamiento con anticuerpos anti-LIGHT redujo significativamente los números totales de linfocitos T humanos total en el bazo (Figura 32). Por lo tanto, tomados en conjunto, estos datos indican que los anticuerpos anti-LIGHT mostraron eficacia *in vivo* en este modelo, reduciendo de forma significativa los signos de enfermedad con respecto al control negativo.

Ejemplo 6 - Análisis cristalográfico por rayos X de la interacción de anticuerpo LIGHT humano/anti-humano (F23)

El anticuerpo F23G1 (o fragmento de Fab del mismo) se usa para evaluar la naturaleza del reconocimiento preferente de hLIGHT trimérico nativo. El análisis estructural permite la identificación de restos específicos de aminoácidos de contacto entre el anticuerpo anti-hLIGHT y la molécula de hLIGHT para definir adicionalmente el epítipo conformacional reconocido por el anticuerpo. La cristalización de complejos de Fab LIGHT-anti-LIGHT se realiza mediante métodos convencionales de difusión de vapor con caída de gotas (véase, *por ejemplo*, McRee 1993 En: Practical Protein Crystallography (Academic Press, San Diego, CA) en las páginas 1-23; Rhodes 1993 En: Crystallography Made Crystal Clear (Academic Press, San Diego, CA) en las páginas 8-10, 29-38. Los cristales se analizan usando un SYNCHROTRON, y los datos se analizan usando el paquete de software CCP4 (Science & Technology Facilities Council, Departamento de Ciencia Computacional e Ingeniería), que es una colección de programas dispares que cubren la mayor parte de los cálculos necesarios para la cristalografía molecular. Como observarán los expertos en la materia, otros anticuerpos hLIGHT que se proporcionan en el presente documento se pueden usar de forma similar para determinar la unión de epítopos de hLIGHT y restos de contacto de aminoácidos.

Ejemplo 7 - Estudio de eficacia *in vivo* de 124F23 en el modelo de enfermedad de colitis

Modelo de colitis de transferencia de linfocitos T humanos. De forma análoga al modelo de colitis de transferencia de CD4+/CD45Rbhi de ratón descrito en Morrissey y col. (1993) J Exp Med. 178 237, ratones RAG-/- se inyectan con linfocitos T humanos sin tratamiento previo (CD45RA+CD45RO-). En este modelo, una cepa transgénica de HLA (C57BL/ 6NTac- (KO) Abb- [Tg] DR- 4) emparejada con el tipo HLA de un donante humano se retrocruza sobre un fondo de RAG-/- (B6,129S6- Rag2^{tm1Fwa}N12) para permitir la presentación de antígenos entre los APC receptores de ratón y los linfocitos T de donante humano. Esta interacción es necesaria para el reconocimiento de linfocitos T de la microflora intestinal, que se cree que es responsable de la activación y búsqueda de linfocitos T en el intestino. Los animales experimentan pérdida de peso y enfermedad debilitante, junto con inflamación intestinal que no se observa en los ratones RAG-/-.

En determinados grupos, un anticuerpo humano-anti-hLIGHT (*por ejemplo*, F23) se administra a una dosis de 100 µg (o, *por ejemplo*, que varía de 2 µg - 500 µg) por animal mediante inyección intravenosa simultáneamente con la administración de linfocitos T de donante humano. En determinados grupos, el anticuerpo anti-hLIGHT se administra en diversos intervalos de tiempo antes y/o después de la administración de linfocitos T de donante humano. Debido a que los anticuerpos anti-LIGHT se unen a LIGHT expresado en la superficie de linfocitos T activados, los síntomas de la enfermedad se previenen y/o tratan. En estudios de seguimiento, las versiones de disminución (IgG1) y/o no disminución (IgG4PE) de linfocitos T de los anticuerpos anti-hLIGHT se pueden usar para evaluar el mecanismo de mejora de la enfermedad. Por ejemplo, anticuerpos anti-LIGHT de IgG4 son capaces de bloquear la coestimulación y supervivencia de linfocitos T.

Ejemplo 8 - Modelo de IBD de enfermedad humana en ratones con genosustitución de LIGHT humano

Tal como se analiza en cualquier parte en el presente documento, LIGHT se ha implicado anteriormente en la patología de la enfermedad IBD (véase, *por ejemplo*, Wang y col. 2005 J. Immunol. 174: 8173-82; Wang y col. 2004 J. Clin. Invest. 113: 826-35; Cohavy y col. 2005 J. Immunol. 174: 646-53). En este ejemplo, se crea un modelo de ratón con genosustitución de hLIGHT de IBD, y se administran al animal anticuerpos monoclonales anti-hLIGHT humano de la presente divulgación para evaluar la eficacia *in vivo* de estos anticuerpos en el tratamiento de la IBD. Dado que estos anticuerpos han mostrado anteriormente que bloquean la unión del receptor de hLIGHT, bloqueando la actividad biológica de hLIGHT (véase, *por ejemplo*, Ejemplos 1-4), y tratando la GVHD (Ejemplo 5), se espera que los anticuerpos hLIGHT de la presente divulgación también sean eficaces en el tratamiento de la IBD.

Generación de genosustitución de LIGHT. Ratones alterados con el gen LIGHT de ratón, que también presentan una inserción dirigida del gen LIGHT humano, se generan usando métodos convencionales de dirección de genes por recombinación homóloga. En breve, células ES de ratón dirigidas a genes se producen por electroporación de un constructo de dirección genética en células ES de tipo silvestre. La recombinación homóloga entre el genoma de las células ES y dos regiones de homología en el vector de dirección que flanquea el gen de LIGHT humano da como resultado el reemplazo del gen LIGHT de ratón con el gen de LIGHT humano. Un blastocito se implanta a

continuación en hembras pseudopreñadas conduciendo la generación de ratones quiméricos. La reproducción produce los animales con genosustitución de LIGHT homólogos.

5 Modelos de IBD de enfermedad humana. Los animales con genosustitución de hLIGHT se usan en modelos establecidos de IBD. Un modelo establecido de IBD incluye la administración de sulfato de dextrano y sodio (DSS) en agua potable (véase, *por ejemplo*, Mähler y col. 1998 Am J Physiol. 274G544-51). En breve, la colitis experimental se induce mediante la administración de DDS al 3,5 % (p/v) (peso molecular de 36, 100-45.000; TbD Consultancy, Uppsala, Suecia) en agua potable acidificada a voluntad durante 5 días. La administración de DDS se detiene a continuación, y los ratones reciben solo agua potable acidificada durante 16 días hasta la necropsia en el día 21. Esta dosis induce colitis de moderada a grave mientras que minimiza la mortalidad, aunque se pueden usar otras dosis. El intestino grueso se recoge a continuación, y el ciego se separa del colon. Se realiza fijación de tejidos y tinción con H y E convencional para determinar la gravedad de la inflamación y las lesiones. Los ratones se evalúan para patología, histopatología, síndrome de debilitamiento y/o muerte.

15 Un segundo modelo establecido de IBD incluye la administración rectal de ácido trinitrobenzeno sulfónico (TNBS) (véase, *por ejemplo*, Neurath, y col. 1995 J Exp Med. 182 1281-90). En breve, para inducir la colitis, los ratones se anestesian brevemente con metofano, y a continuación se inserta cuidadosamente un catéter de 3,5 F en el colon, de modo que el tiempo es de aproximadamente 4 cm. proximal hasta el ano. Para inducir la colitis, 0,5 mg de TNBS reactivo de hapteno (Sigma, St. Louis, MO) en etanol al 50 % (para romper la barrera intestinal) se insertan en el lumen del colon a través del catéter ajustado sobre una jeringa de 1 ml. En experimentos de control, los ratones recibieron etanol al 50 % solo. El volumen de inyección total es de 100 µl en ambos grupos permitiendo que TNBS o etanol alcancen todo el colon, incluyendo el ciego y el apéndice. Los animales se mantienen a continuación en una posición vertical durante 30 segundos y se devuelven a sus jaulas, o el modelo de transferencia de CD4+/CD45Rbhi de colitis de ratón (véase, *por ejemplo*, Morrissey, y col. 1993 J Exp Med. 178 237-44). A continuación se pueden usar anticuerpos anti-LIGHT para tratamiento y prevención de la enfermedad establecida, en dosis tales como 2-500 µg por animal, básicamente tal como se ha descrito anteriormente. El intestino grueso se recoge a continuación, y el ciego se separa del colon. A partir de ese momento en diversos puntos temporales, el intestino se retira, y se realiza fijación de tejidos y tinción con H y E convencional para determinar la gravedad de la inflamación y las lesiones. Los ratones evalúan para la patología, histopatología, síndrome de debilitamiento y/o muerte.

30 Un tercer modelo establecido de IBD es el modelo de transferencia de CD4+/CD45RBhi de colitis de ratón (véase, *por ejemplo*, Morrissey, y col. 1993 J Exp Med. 178 237-44). En breve, linfocitos T purificados de los nódulos linfáticos de CD4+ se clasifican de acuerdo con su expresión de CD45RB y se inyectan en los ratones con genosustitución de hLIGHT. A continuación se realiza fijación de tejidos y tinción con H y E convencional para determinar la gravedad de la inflamación y las lesiones. Los ratones evalúan para la patología, histopatología, síndrome de debilitamiento y/o muerte.

35 Se pueden usar anticuerpos anti-LIGHT (*por ejemplo*, dosis de 2-500 µg por animal) con cualquier modelo de IBD, tal como los que se han descrito anteriormente, para evaluar la eficacia en el tratamiento y la prevención de IBD, básicamente tal como se ha descrito anteriormente. Debido a que estos anticuerpos han mostrado anteriormente que bloquean la unión del receptor de hLIGHT, bloquean la actividad biológica de hLIGHT (véase, *por ejemplo*, Ejemplos 1-4), y tratan la GVHD (Ejemplo 5), se espera que los anticuerpos hLIGHT de la presente divulgación también sean eficaces en el tratamiento de la IBD.

45 Las realizaciones de la presente invención que se han descrito anteriormente pretenden ser solamente a modo de ejemplo, y los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar usando nada más que experimentación de rutina, numerosos equivalentes a los procedimientos específicos que se describen en el presente documento. Además, tal como se usa la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones, las formas en singular "un," "uno" y "el" incluyen formas en plural a menos que el contenido no indique claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una mezcla de dos o más de dichos anticuerpos, y similares.

Otras realizaciones están dentro de las siguientes reivindicaciones.

55 LISTADO DE SECUENCIAS tal como se presenta en la patente divisional

<110> Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. La Jolla institute for Allergy & Immunology

60 <120> Anticuerpos antagonistas monoclonales humanos específicos de LIGHT humano

<130> 7505-049-228

<140>

<141>

65

ES 2 439 994 T3

<150> 60/840.774
 <151> 28-08-2006

5 <150> 60/897.875
 <151> 25-01-2007

<160> 106

<170> FastSEQ para windows versión 4.0

10 <210> 1
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada E1

20 <400> 1

```

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

25 <210> 2
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada E13

<400> 2

```

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

ES 2 439 994 T3

Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Gly Arg Ile Lys Ser Lys Ile Asp Gly Gly Thr Thr Asp
 65 70 75 80
 Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95
 Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 100 105 110
 Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Ala Met Ala Gly Ala Phe Gly Phe Trp
 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

5 <210> 3
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada E63
 <400> 3

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

15 <210> 4
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada F19
 <400> 4

ES 2 439 994 T3

```

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

```

```

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      130      135      140

```

5 <210> 5
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Región variable de la cadena pesada F23
 <400> 5

```

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

```

15 <210> 6
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera kappa E1 nº 2 (E1 kappa(B))
 <400> 6

ES 2 439 994 T3

```

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

```

<210> 7
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> Región variable de la cadena ligera kappa E13

10

<400> 7

```

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

```

15

<210> 8
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<220>
 <223> Región variable de la cadena ligera kappa E63

<400> 8

ES 2 439 994 T3

```

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

```

<210> 9
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> Región variable de la cadena ligera kappa F19 nº 2

10

<400> 9

```

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

      85      90      95
Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
      100      105      110
Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
      115      120      125
Lys

```

<210> 10
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>
 <223> Región variable de la cadena ligera kappa F23

20

<400> 10

```

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

```

5 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> CDR1 de la región variable de la cadena pesada E1
 <400> 11

```

Arg Phe Asn Met Asn
 1      5

```

15 <210> 12
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada E1
 <400> 12

```

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

```

30 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada E1
 <400> 13

```

Ser Ile Ala Ala Phe Asp Tyr
 1      5

```

40 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 439 994 T3

<220>
<223> CDR1 de la región variable de la cadena pesada E13
<400> 14
5
Asn Ala Trp Met Ser
1 5
<210> 15
<211> 19
10 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<220>
<223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada E13
15 <400> 15
Arg Ile Lys Ser Lys Ile Asp Gly Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Ala Pro
1 5 10 15
Val Lys Gly
20 <210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
25 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada E13
<400> 16
30 Ala Met Ala Gly Ala Phe Gly Phe
1 5
<210> 17
<211> 7
35 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<220>
<223> CDR1 de la región variable de la cadena pesada E63
40 <400> 17
Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5
<210> 18
<211> 16
45 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<220>
<223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada E63
50 <210> 19
Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15
55 <211> 12

ES 2 439 994 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada E63

<400> 19

Trp Ile Thr Met Phe Arg Gly Val Gly Phe Asp Pro
1 5 10

10 <210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

15 <220>
<223> CDR1 de la región variable de la cadena pesada F19 nº 2 (F19 kappa(B))

<400> 20

20 Gly Tyr Asn Trp His
1 5

25 <210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <220>
<223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada F19 nº 2 (F19 kappa(B))

<400> 21

Glu Ile Thr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

35 <210> 22
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada F19 nº 2 (F19 kappa(B))

<400> 22

Glu Ile Ala Val Ala Gly Thr Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

45 <210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50 <220>
<223> CDR1 de la región variable de la cadena pesada F23

<400> 23

Gly Tyr Tyr Trp Asn
1 5

ES 2 439 994 T3

5 <210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> CDR2 de la región variable de la cadena pesada F23
10 <400> 24

Glu Ile Asn Gln Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10

15 <210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena pesada F23
<400> 25

Glu Ile Ala Ile Ala Asp Lys Gly Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
1 5 10

25 <210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <220>
<223> CDR1 de la región variable de la cadena ligera E1 nº 2 (E1 kappa(B))
<400> 26

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

40 <210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <220>
<223> CDR2 de la región variable de la cadena ligera E1 nº 2 (E1 kappa(B))
<400> 27

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

50 <210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera E1 nº 2 (E1 kappa(B))
<400> 28

ES 2 439 994 T3

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Met Tyr Thr
1 5

5 <210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> CDR1 de la región variable de la cadena ligera E13
<400> 29

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

15 <210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <220>
<223> CDR2 de la región variable de la cadena ligera E13
<400> 30

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

25 <210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera E13
<400> 31

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Tyr Thr
1 5 10

35 <210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <220>
<223> CDR1 de la región variable de la cadena ligera E63
<400> 32

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

45 <210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50 <220>
<223> CDR2 de la región variable de la cadena ligera E63

ES 2 439 994 T3

<400> 33

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

5 <210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera E63

<400> 34

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr
1 5

15 <210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <220>
<223> CDR1 de la región variable de la cadena ligera F19 nº 2 (F19 kappa(B))

25 <400> 35

Arg Ala Ser Arg Gly Ile Asn Ser Ala Phe Ala
1 5 10

30 <210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <220>
<223> CDR2 de la región variable de la cadena ligera F19 nº 2 (F19 kappa(B))

<400> 36

Asp Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

40 <210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera F19 nº 2 (F19 kappa(B))

<400> 37

50 Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

55 <210> 38
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>

ES 2 439 994 T3

<223> CDR1 de la región variable de la cadena ligera F23

<400> 38

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

5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

10

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> CDR2 de la región variable de la cadena ligera F23

15

<400> 39

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 1 5

20

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<220>

<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera F23

<400> 40

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

30

<210> 41

<211> 408

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

35

<220>

<223> ADNc de la región variable de la cadena pesada E1

<400> 41

40

```
atggagttgg ggctgtgctg ggttttcctt gttgctatTT tagaagggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtcctt gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac cttcagtaga tttaacatga actgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ttcatacatt agtagtagta gttataccat atactacgca 240
gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaactc actggatctg 300
caaatgaaca gcctgagaga cgaggacacg gctgtgtatt actgtgctgag gagtatagca 360
gcagcttttg actactgggg ccagggagcc ctggtcaccg tctcctca 408
```

45

<210> 42

<211> 414

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> ADNc de la región variable de la cadena pesada E13

50

<400> 42

ES 2 439 994 T3

```

atggagtttg ggctgagctg gattttcctt gctgcgattt taaaagggtg ccagtgtgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcctg gtaaagcctg gggggtcct tagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac tctcagtaac gcctggatga gctgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt tggccgtatt aaaagcaaaa tagatgggtg gacaacagac 240
tacgctgcac ccgtgaaagg cagattcacc atctcaagag atgattcaaa aaacacgctg 300
ttctgcaaa tgaacagcct gaaaaccgag gacacagccg tgtattactg taccacagca 360
atggctgggt cgtttggctt ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 414

```

<210> 43
 <211> 423
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> ADNc de la región variable de la cadena pesada E63

10

<400> 43

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60

```

```

gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcattgtct ctggtggctc cgtcagcagt ggtggttact actggagctg gatccggcag 180
ccccagggga agggactgga gtggattggg tataatctatt acagtgggag caccaactac 240
aacccctccc tcaagagtcg agtcaccata tcagtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 300
ctgaagctga gctctgtgac cgctgcggac acggccgtgt attactgtgc gagatggatt 360
actatgtttc ggggagttgg gttcagacccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420
tca 423

```

15

<210> 44
 <211> 423
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20

<220>
 <223> ADNc de la región variable de la cadena pesada F19

<400> 44

```

atgaaacacc tgtggttctt cctcctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag 60
gtgcagctac agcagtgggg cgcaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120
tgcgctgtct atgggtgggtc cttcagtggg tacaactggc actggatccg ccagccccc 180
gggaaggggc tggagtggat tggggaaatc actcatagtg gaagcaccaa ttacaacccg 240
tccctcaaga gtcgagtcac catafcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag 300
ctgagctctg tgaccgcccg ggacacggct gtgtattact gtgtgcgaga gattgcagtg 360
gctggtacgg gctactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 420
tca 423

```

25

<210> 45
 <211> 429
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30

<220>
 <223> ADNc de la región variable de la cadena pesada F23

35

<400> 45

ES 2 439 994 T3

```

atggacctcc tgcacaagaa catgaaacac ctgtggttct tcctcctcct ggtggcagct 60
cccagatggg tcctgtccca ggtgcagcta cagcagtggg gcgcaggact gttgaagcct 120
tcggagaccc tgccctcac ctgcgctgtc tatgggtggg ccttcagtgg ttactactgg 180
aactggatcc gccagcccc agggaaaggg ctggagtgga ttggggaaat caatcagtac 240
aaccctgcc tcaagagtcg agtcaccata tcagtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 300
ctgaagctga gctctgtgac cgccgcggac acggctgtgt attactgtgc gagagagata 360
gcaacagctg ataaagggta ctacggtttg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 420
gtctcctca

```

<210> 46
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> ADNc de la región variable de la cadena ligera kappa E1 nº 2 (E1 kappa(B))

<400> 46

```

atggaaacc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaatttgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact taacctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaatgta cacttttggc 360
caggggacca agctggagat caaa

```

<210> 47
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> ADNc de la región variable de la cadena ligera kappa E13

<400> 47

```

atggaaacc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaatttgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccat gtacactttt 360
ggcagggga ccaagctgga gatcaaacga

```

<210> 48
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> ADNc de la región variable de la cadena ligera kappa E63

<400> 48

```

atgtcggcat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa 60
attgtgctga ctcagtcctc agactttcag tctgtgactc caaggagaa agtcaccatc 120
acctgccggg ccagtcagag cattggtagt agcttacact ggtaccagca gaaaccagat 180
cagctccaa agctctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg 240
ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc accctcacca tcaatagcct ggaagctgaa 300
gatgctgcag catattactg tcatcagagt agtagtttac ctctcacttt cggcggaggg 360
accaaggtgg agatcaaa

```

ES 2 439 994 T3

<210> 49
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> ADNc de la región variable de la cadena ligera kappa F19 n° 2 (F19 kappa(B))

10

```

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
agatgtgcca tccagttgac ccagtcctca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcggggc attaacagtg cttttgcctg gtatcagcag 180
aaaccagggg aagctcctaa gctcctgatc tatgatgcct ccagtttggg aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttacc tctcactttc 360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaaa                                     387
  
```

15

<210> 5.0
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

20

<220>
 <223> ADNc de la región variable de la cadena ligera kappa F23

25

```

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
agatgtgcca tccagttgac ccagtcctca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag 180
aaaccagggg aagctcctaa gctcctgatc tatgatgcct ccagtttggg aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttacc gctcactttc 360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaaa                                     387
  
```

30

<210> 51
 <211> 723
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de un hLIGHT

35

```

atggaggaga gtgtcgtacg gccctcagtg tttgtggtgg atggacagac cgacatccca 60
ttcacgaggc tgggacgaag ccaccggaga cagtcgtgca gtgtggcccg ggtgggtctg 120
ggtctcttgc tgttgctgat gggggccggg ctggccgtcc aaggctggtt cctcctgcag 180
ctgcaactga gtctaggaga gatggtcacc cgcctgcctg acggacctgc aggctcctgg 240
gagcagctga tacaagagcg aaggtctcac gagggtcaacc cagcagcgca tctcacaggg 300
gccaaactca gcttgaccgg cagcgggggg ccgctgttat gggagactca getgggctg 360
gccttccctg ggggcctcag ctaccacgat ggggcccctg tggtcaccaa agctggctac 420
tactacatct actccaaggt gcagctgggc ggtgtgggct gcccgctggg cctggccagc 480
accatcacc acggcctcta caagcgaca ccccgctacc ccgaggagct ggagctgttg 540
gtcagccagc agtcaccctg cggaccggcc accagcagct cccgggtctg gtgggacagc 600
agcttcctgg gtggtgtggt acacctggag gctggggagg aggtggtcgt ccgtgtgctg 660
gatgaacgcc tggttcgact gcgtgatggt acccggctct acttcggggc tttcatgggt 720
tga                                                                                                     723
  
```

40

<210> 52
 <211> 240
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> hLIGHT de longitud completa

5 <400> 52

```

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

10 <210> 53
 <211> 630
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <223> hLIGHT soluble con etiqueta FLAG (240 aa)

<400> 53

```

atgcctggga agatggctgt gatccttggga gcctcaaata tactttggat aatgtttgca 60
gcttctcaag ctgactacaa ggacgacgat gacaagtacg taggagagat ggtcaccgcg 120

ctgcctgacg gacctgcagg ctcttgggag cagctgatac aagagcgaag gtctcacgag 180
gtcaaccag cagcgcctct cacaggggccc aactccagct tgaccggcag cggggggccg 240
ctgttatggg agactcagct gggcctggcc ttcttgaggg gcctcagcta ccacgatggg 300
gcccttgtgg tcaccaaagc tggctactac tacatctact ccaaggtgca gctgggcggt 360
gtgggctgcc cgctgggcct ggccagcacc atcaccacag gcctctacaa gcgcacacc 420
cgctaccccg aggagctgga gctgttggtc agccagcagt caccctgcgg acgggccacc 480
agcagctccc gggctctggg ggacagcagc ttcttgggtg gtgtgtgaca cctggaggct 540
ggggaggagg tggctctccg tgtgctggat gaacgcctgg ttcgactgcg tgatggtacc 600
cggctctact tcggggcttt catggtgtga 630
    
```

20 <210> 54
 <211> 183
 <212> PRT

ES 2 439 994 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> hLIGHT soluble con etiqueta FLAG (183 aa)

5

<400> 54

```

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

10

<210> 55

<211> 22

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> cebador RACEUPS5'

<400> 55

ctaatacgac tcactatagg gc 22

20

<210> 56

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> cebador IgG1p

<400> 56

30

tctgtccac ctgggtgtg ctgggcttgt g 31

<210> 57

<211> 30

<212> ADN

35

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador HK5

40

<400> 57

aggcacacaa cagaggcagt tccagattc 30

<210> 58

ES 2 439 994 T3

<211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cebador M13F

<400> 58
 gtaaaacgac ggccagtg 18

10

<210> 59
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> cebador M13R

<400> 59
 caggaaacag ctatgac 17

20

<210> 60
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> cebador E63HF85

30

<400> 60
 agagagagag gtcgaccacc atgaaacacc tgtggttctt c 41

35

<210> 61
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> cebador E63HR38

<400> 61
 gagagagaga gctagctgag gagacggtga ccagggt 37

45

<210> 62
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> cebador E63LF84

<400> 62
 agagagagag atctctcacc atgtcgccat cacaactcat tg 42

55

<210> 63
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> cebador E63LR43

<400> 63
 agagagagag cgtacggttg atctccacct tggccctcc 40

65

<210> 64

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cebador HH-2

<400> 64
 gctggagggc acggtcacca cgctg 25

10

<210> 65
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> cebador HK-2

<400> 65
 gttgaagctc tttgtgacgg gcgagc 26

20

<210> 66
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> cebador F23HF86

<400> 66
 agagagagag gtcgaccacc atggacctcc tgcacaagaa c 41

30

<210> 67
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> cebador F23HR55

40

<400> 67
 agagagagag gctagctgag gagacggtga ccgt 34

45

<210> 68
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> cebador F23LF36

<400> 68
 agagagagag atctctcacc atggacatga gggccccgc tc 42

55

<210> 69
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> cebador F23LR43

<400> 69
 agagagagag cgtacgttg atctccacct tggccctcc 40

65

<210> 70

<211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cebador E1HFSall

<400> 70
 agagagagag gtcgaccacc atggagttgg ggctgtgctg g 41

10

<210> 71
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> cebador E1HRNhel

<400> 71
 agagagagag gctagctgag gagacggtga ccagggc 37

20

<210> 72
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> cebador F19HFSall

<400> 72
 agagagagag gtcgaccacc atgaaacacc tgtggttctt c 41

30

<210> 73
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> cebador F19HRNhel

40

<400> 73
 agagagagag gctagctgag gagacggtga ccgtggt 37

45

<210> 74
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador E1KF2+3BgIII

50

<400> 74
 agagagagag atctctcacc atggaaaccc cagcgcagct tc 42

55

<210> 75
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> cebador E1KR2Bsiwl

<400> 75
 agagagagag cgtacgttg atctccagct tggcccctg 40

65

<210> 76

ES 2 439 994 T3

<211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> cebador E1KR3BsiwI

<400> 76
 agagagagag cgtacgttg attccacct tggcccttg 40

10

<210> 77
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> cebador F19KR1+2BsiWI

<400> 77
 agagagagag cgtacgttg atctccacct tggccctcc 40

20

<210> 78
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> cebador F19KR3BsiWI

30

<400> 78
 agagagagag cgtacgttg atctccagct tggccctcg 40

<210> 79
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> cebador F19KFI+2+3BgIII

40

<400> 79
 agagagagag atctctcacc atggacatga gggccccgc tc 42

45

<210> 80
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> cebador directo

<400> 80
 gtaggagaga tggcaccgc cct23

55

<210> 81
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> cebador inverso

<400> 81
 ggaacgcgaa ttcccacgtg tcagacccat gtccaat 37

65

<210> 82

ES 2 439 994 T3

<211> 128
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <223> Región variable de la cadena ligera kappa E1 nº 1 (E1 kappa(A))

<400> 82

```

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

10

<210> 83
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de ADNc de la región variable de la cadena ligera kappa E1 nº 3 (E1 kappa(C))

20

<400> 83

```

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

25 <210> 84
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <223> CDR1 de la región variable de la cadena ligera E1 nº 1 (E1 kappa(A))

<400> 84

ES 2 439 994 T3

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

5 <210> 85
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> CDR1 de la región variable de la cadena ligera E1 nº 3 (E1 kappa(C))
<400> 85

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

15 <210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <220>
<223> CDR2 de la región variable de la cadena ligera E1 nº 1 (E1 kappa(A))
<400> 86

Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser
1 5

25 <210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <220>
<223> CDR2 de la región variable de la cadena ligera E1 nº 3 (E1 kappa(C))
35 <400> 87

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

40 <210> 88
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <220>
<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera E1 nº 1 (E1 kappa(A))
<400> 88

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Arg Thr
1 5

50 <210> 89
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 439 994 T3

<220>
 <223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera E1 nº 3 (E1 kappa(C))

5 <400> 89

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5

<210> 90
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>
 <223> Región variable de la cadena ligera kappa F19 nº 1 (F19 kappa(A))

15

<400> 90

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

20

<210> 91
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<220>
 <223> Región variable de la cadena ligera kappa F19 nº 3 (F19 kappa(C))

<400> 91

30

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

ES 2 439 994 T3

<210> 92
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de ADNc de la región variable de la cadena ligera kappa F19 nº 4 (F19 kappa(D))

10

<400> 92

```

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

15

<210> 93
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<220>
 <223> CDR1 de la región variable de la cadena ligera F19 nº 1 (F19 kappa(A))

<400> 93

```

Arg Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
      1           5           10
    
```

25

<210> 94
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<220>
 <223> CDR1 de la región variable de la cadena ligera F19 nº 3 (F19 kappa(C))

<400> 94

```

Arg Met Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
      1           5           10
    
```

40

<210> 95
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45

<220>
 <223> CDR1 de la región variable de la cadena ligera F19 nº 4 (F19 kappa(D))

ES 2 439 994 T3

<400> 95

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

5 <210> 96

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <220>

<223> CDR2 de la región variable de la cadena ligera F19 nº 1 (F19 kappa(A))

<400> 96

Ser Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5

15

<210> 97

<211> 7

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> CDR2 de la región variable de la cadena ligera F19 nº 3 (F19 kappa(C))

25 <400> 97

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

30 <210> 98

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <220>

<223> CDR2 de la región variable de la cadena ligera F19 nº 4 (F19 kappa(D))

<400> 98

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

40

<210> 99

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45 <220>

<223> CDR3 de la región variable de la cadena ligera F19 nº 1 (F19 kappa(A))

<400> 99

50

Gln Arg Thr Asn Ala Pro Pro Thr
1 5

55 <210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

ES 2 439 994 T3

<400> 104

```

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctac tgctctgggt cccaggtgcc 60
agatgtgaca tccagttgac ccagctctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120
gtcaccatca cttgccgggt gagtcagggc attagcagtt atttaaattg gtatcggcag 180
aaaccagggg aagttcctaa gctcctgac tatagtgcac ccaatttgca atctggagtc 240
ccatctcggg tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcactat cagcagcctg 300
cagcctgaag atgttgcaac ttattacggg caacggactt acaatgcccc tcccactttc 360
ggcggagggg ccaaggtgga gatcaaa 387

```

5 <210> 105
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> ADN de la región variable de la cadena kappa F19 nº 3 (F19 kappa(C))

<400> 105

```

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
agatgtgtca tctggatgac ccagctctcca tccttactct ctgcatctac aggagacaga 120
gtcaccatca gttgtcggat gagtcagggc attagcagtt atttagcctg gtatcagcaa 180
aaaccagggg aagccccga gctcctgac tatgctgcac ccactttgca aagtggggtc 240
ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagctgcctg 300
cagctgaag attttgaac ttattactgt caacagattt atagtttccc gtacactttt 360
ggcaggggga ccaagctgga gatcaaa 387

```

15 <210> 106
 <211> 380
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> ADNc de la región variable de la cadena kappa F19 nº 4 (F19 kappa(D))

25 <400> 106

```

atggaagccc cagcgcagct tctcttctct ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca ggggtgtagc agctacttag cctggtaaca gcagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtgggcc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagatttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcattccgt tcggccaagg 360
gaccaaggtg gagattcaaà 380

```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo de hLIGHT en donde el anticuerpo comprende
 - 5 A. (a) una VH de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC; y (b) una VL de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC, o
 - 10 B.
 - (a) una CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de VH de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC; y
 - (b) una CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo aislado es un anticuerpo producido por el hibridoma de
 - 15 N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende:
 - 20 (a) una región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4; y
 - (b) una región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEC ID N°: 90, 91 o 92.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo comprende:
 - 25 (a) una región variable de cadena pesada que comprende:
 - (1) una CDR1 de VH de SEC ID N°: 20;
 - (2) una CDR2 de VH de SEC ID N°: 21; y
 - (3) una CDR3 de VH de SEC ID N°: 22;
 - 30 y
 - (b) una región variable de cadena ligera que comprende un VL seleccionado entre el grupo que consiste en:
 - 35 (1) una CDR1 de VL de SEC ID N°: 93, una CDR2 de VL de SEC ID N°: 96 y una CDR3 de VL de SEC ID N°: 99;
 - (2) una CDR1 de VL de SEC ID N°: 94, una CDR2 de VL de SEC ID N°: 97 y una CDR3 de VL de SEC ID N°: 100; y
 - (3) una CDR1 de VL de SEC ID N°: 95, una CDR2 de VL de SEC ID N°: 98 y una CDR3 de VL de SEC ID N°: 101.
5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el anticuerpo comprende un dominio constante de IgG.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo comprende un dominio constante de IgG1 o de IgG4.
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano, o en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado, o
 - 50 en donde el anticuerpo es un fragmento de unión a antígenos, o
 - en donde el anticuerpo es un fragmento de Fab, fragmento de F(ab')₂, Fv de una sola cadena (sFv), fragmento divalente, fragmento trivalente o minicuerpo.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o
 - 55 un anticuerpo recombinante.
9. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
10. Una molécula aislada de ácido nucleico
 - 60 (i) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica (a) una secuencia de aminoácidos de VH de un anticuerpo producido por un hibridoma depositado con N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC; y (b) una secuencia de aminoácidos de VL de un anticuerpo producido por un hibridoma depositado con N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC,
 - 65 o
 - (ii) que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica (a) una CDR1 de VH, CDR2 de VH y CDR3 de

VH de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC; y (b) una CDR1 de VL, CDR2 de VL y CDR3 de VL de un anticuerpo producido por un hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC,

o

- 5 (iii) que comprende o que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un anticuerpo producido por un hibridoma depositado con N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC,
(iv) que comprende (a) una secuencia que se describe en la SEC ID N°: 44; y (b) una secuencia que se describe en una cualquiera de las SEC ID N°: 104, 105 o 106.
- 10 11. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 10.
12. Una célula huésped que comprende el vector de la reivindicación 11.
- 15 13. Un método para producir el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, método que comprende el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 12 en condiciones que promueven la producción del anticuerpo.
14. Un hibridoma que produce un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 20 15. El hibridoma de la reivindicación 14, hibridoma que tiene N° de Acceso PTA-7819 de la ATTC.
16. Un kit que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o la composición de la reivindicación 9.

FIGURA 1

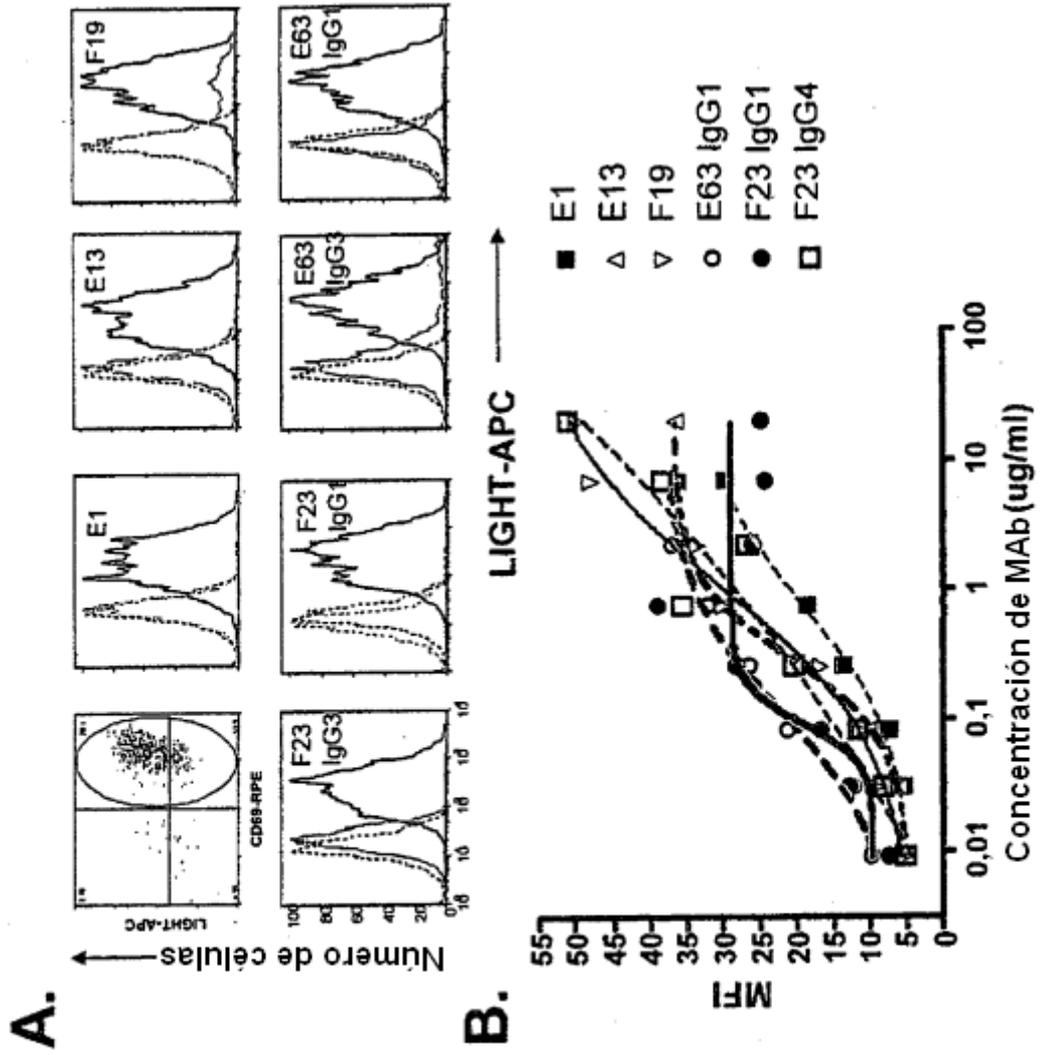


FIGURA 2

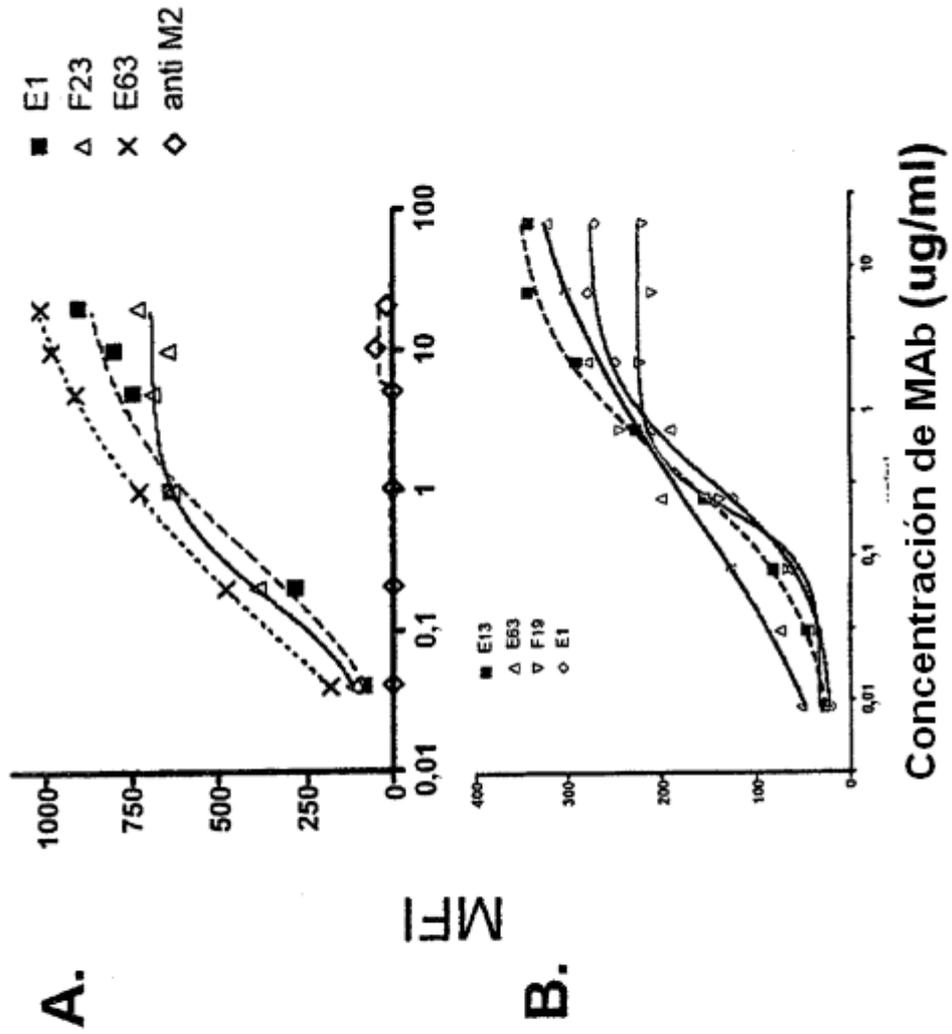


FIGURA 3

Nombre	Unión a HuLIGHT sobre Células EL4GFP HuLIGHT		Bloqueo de Unión de LIGHT de Superficie Celular a HVEM:Fc			Bloqueo de Unión de LIGHT de Superficie Celular a LTR:Fc			Bloqueo CCL20	Isotipo	Grupo Eptopo	
	afinidad relativa	EC50 (µg/ml)	Humano	IC50 (µg/ml)	Ratón	IC50 (µg/ml)	Humano	IC50 (µg/ml)				Ratón
124E 63	+++	0,1	++++	0,19	-	++++	1,3	+++	0,43	+	IgG3	A
124E 1	+++	0,32	++++	0,2	+++	+++	1,7	+++	2,8	+	IgG1	A
124F 23	+++	0,18	+++	0,29	-	+++	2,1	-	-	+	IgG4	B
124E13	+++	0,3	++	0,41	IID	+++	1,8	+++	IID	+	IgG1	A
124F 19	+++	0,21	IID	IID	IID	++	4,2	++	3,9	+	IgG1	B

FIGURA 4

<u>Pre-inc. mAb</u>	Revestimiento mAb				
	<u>E1</u>	<u>E13</u>	<u>E63</u>	<u>F19</u>	<u>F23</u>
E1	95	82	89	0	0
E13	98	97	98	0	0
E63	87	90	84	0	22
F19	0	0	0	98	98
F23	0	0	0	53	87

Epitopo de hLIGHT N° 1 ("anticuerpos E")	E1, E13, E63
Epitopo de hLIGHT N° 2 ("anticuerpos F")	F19, F23

FIGURA 5

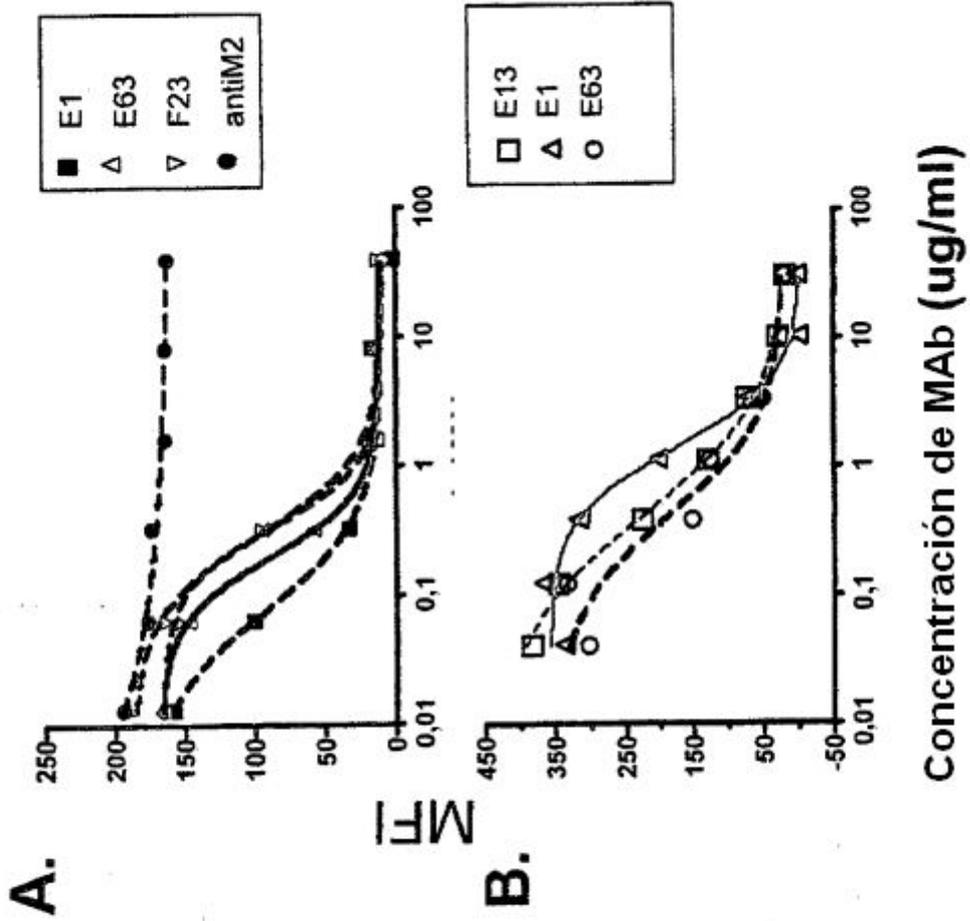


FIGURA 6

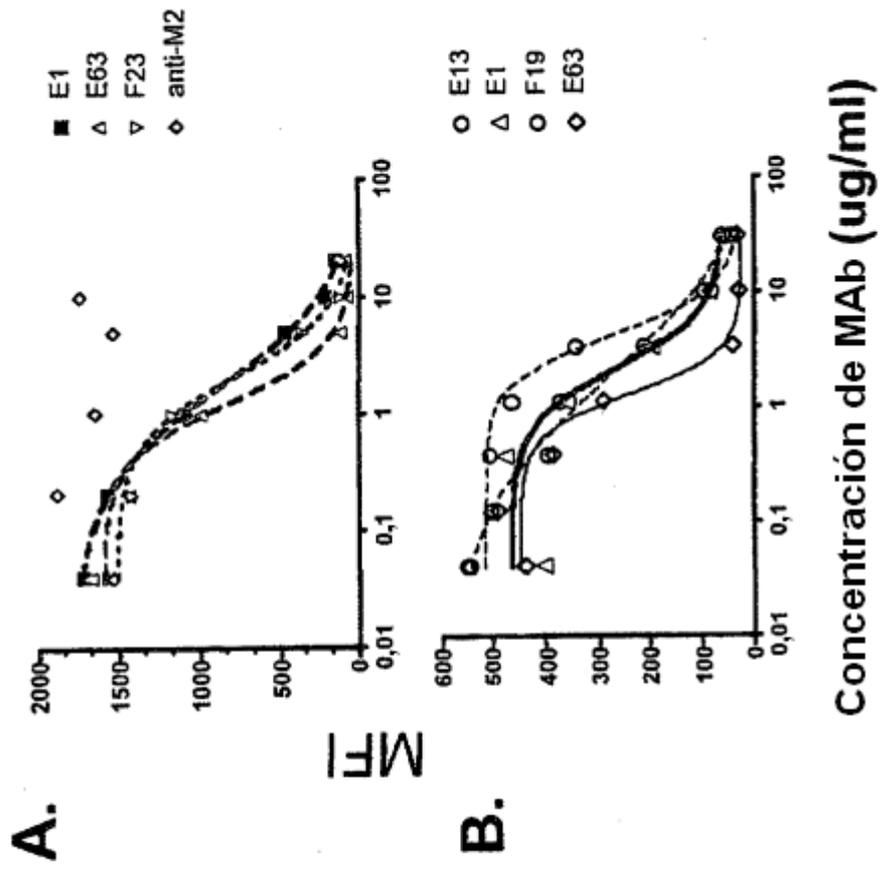


FIGURA 7

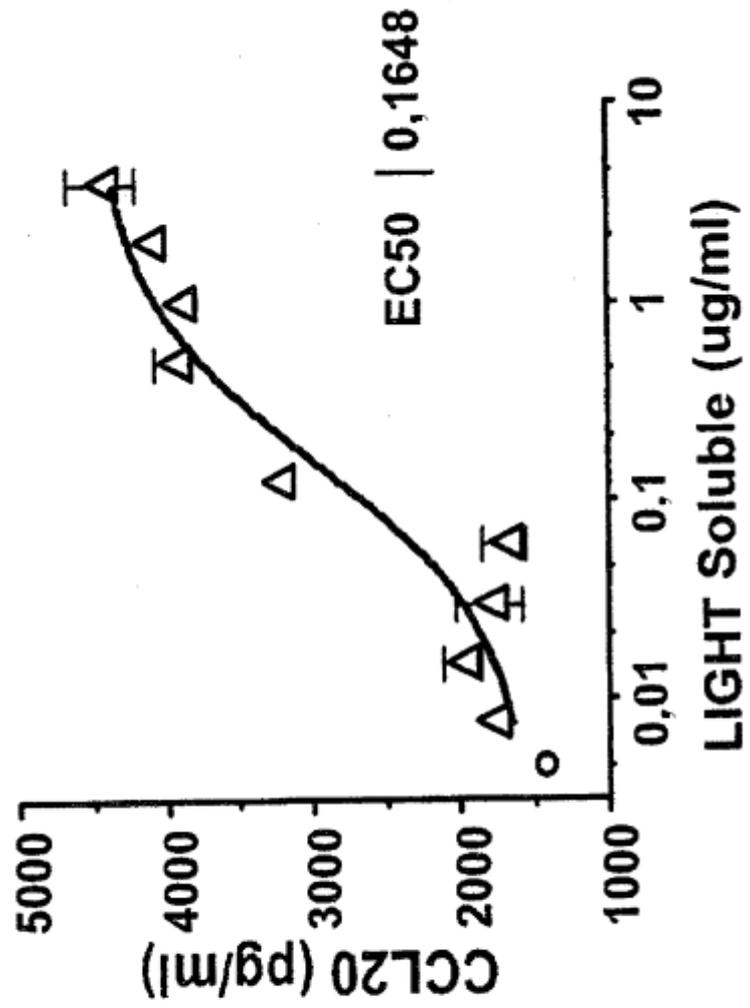


FIGURA 8

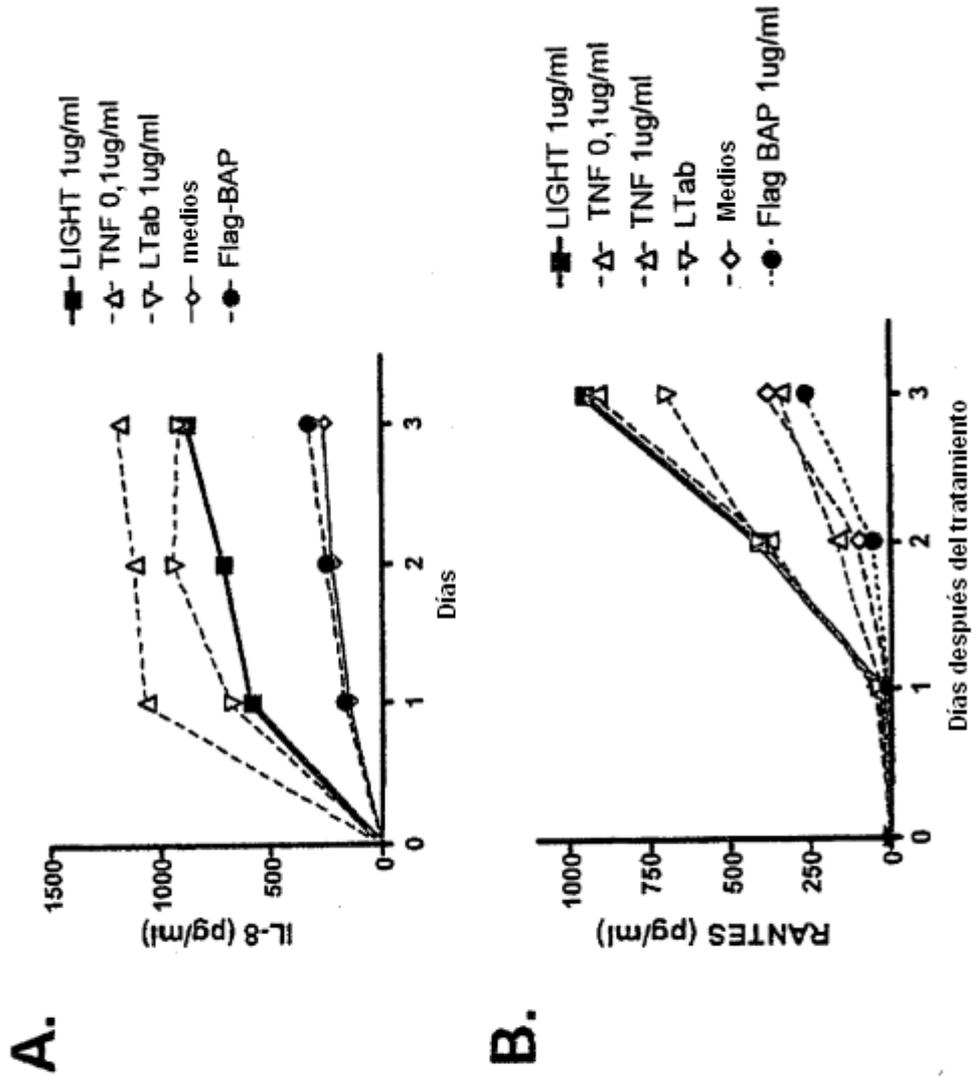


FIGURA 10

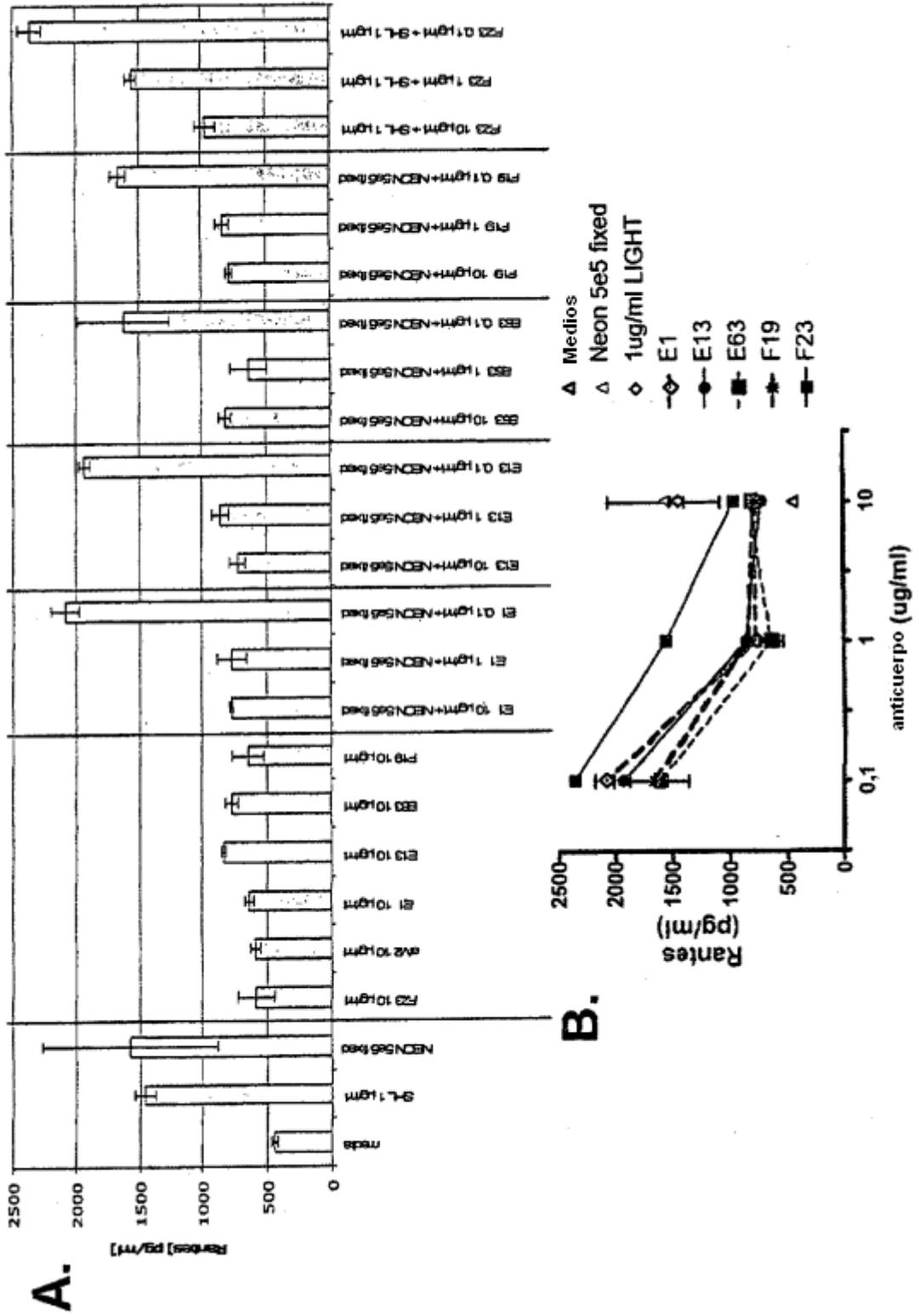


FIGURA 11

Ab Soluble	Ab revestido					
	E1	B12	F19	R&D mAb	Abnova	E45
E1	94	22	15	99	0	99
B12	17	97	16	0	61	11
F19	4	0	99	99	0	7
R&D mAb	47	0	86	92	0	78
Abnova	30	97	15	38	89	64
E45	60	5	8	99	64	98
AntiM2	0	0	0	0	0	0

FIGURA 12

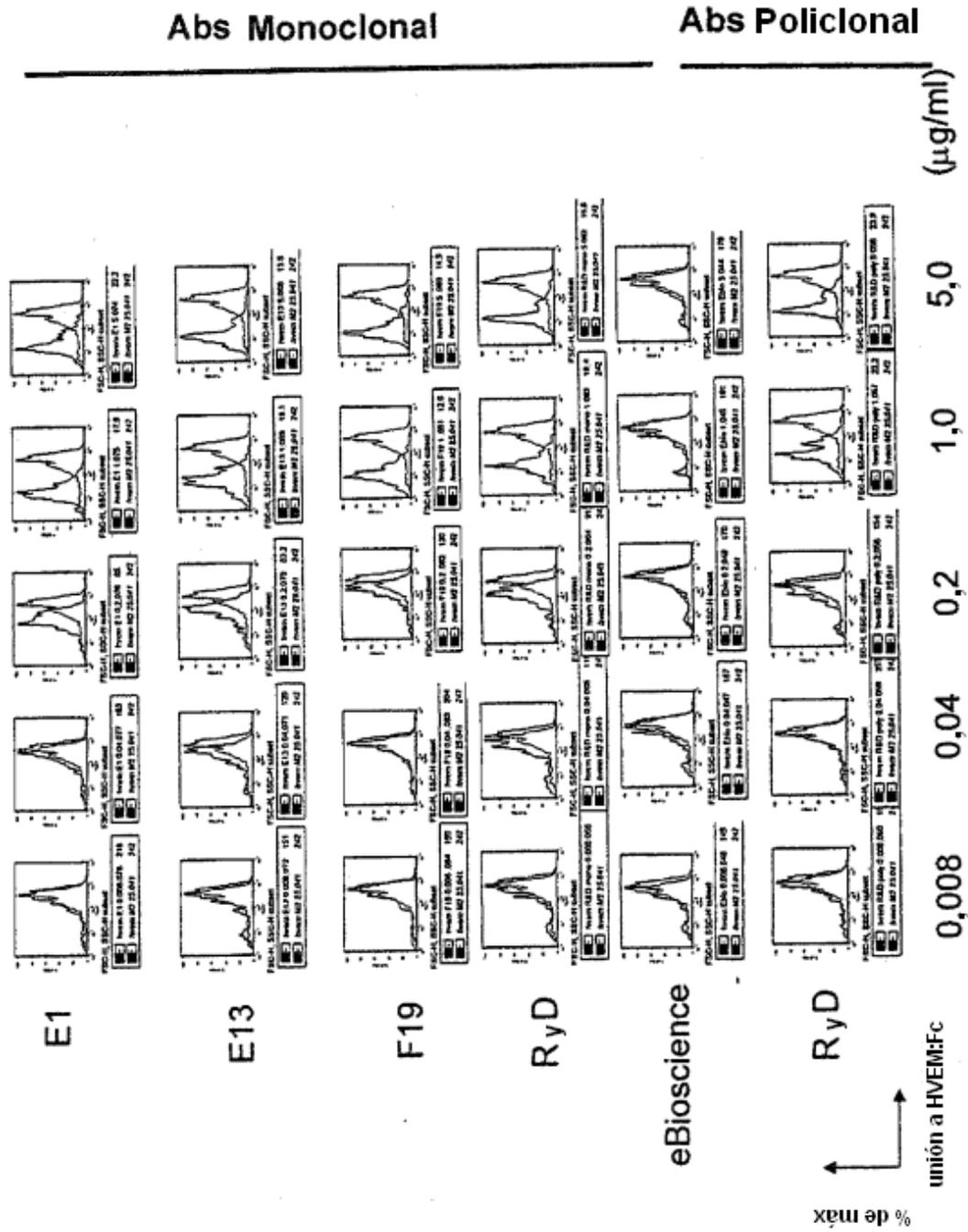


FIGURA 13

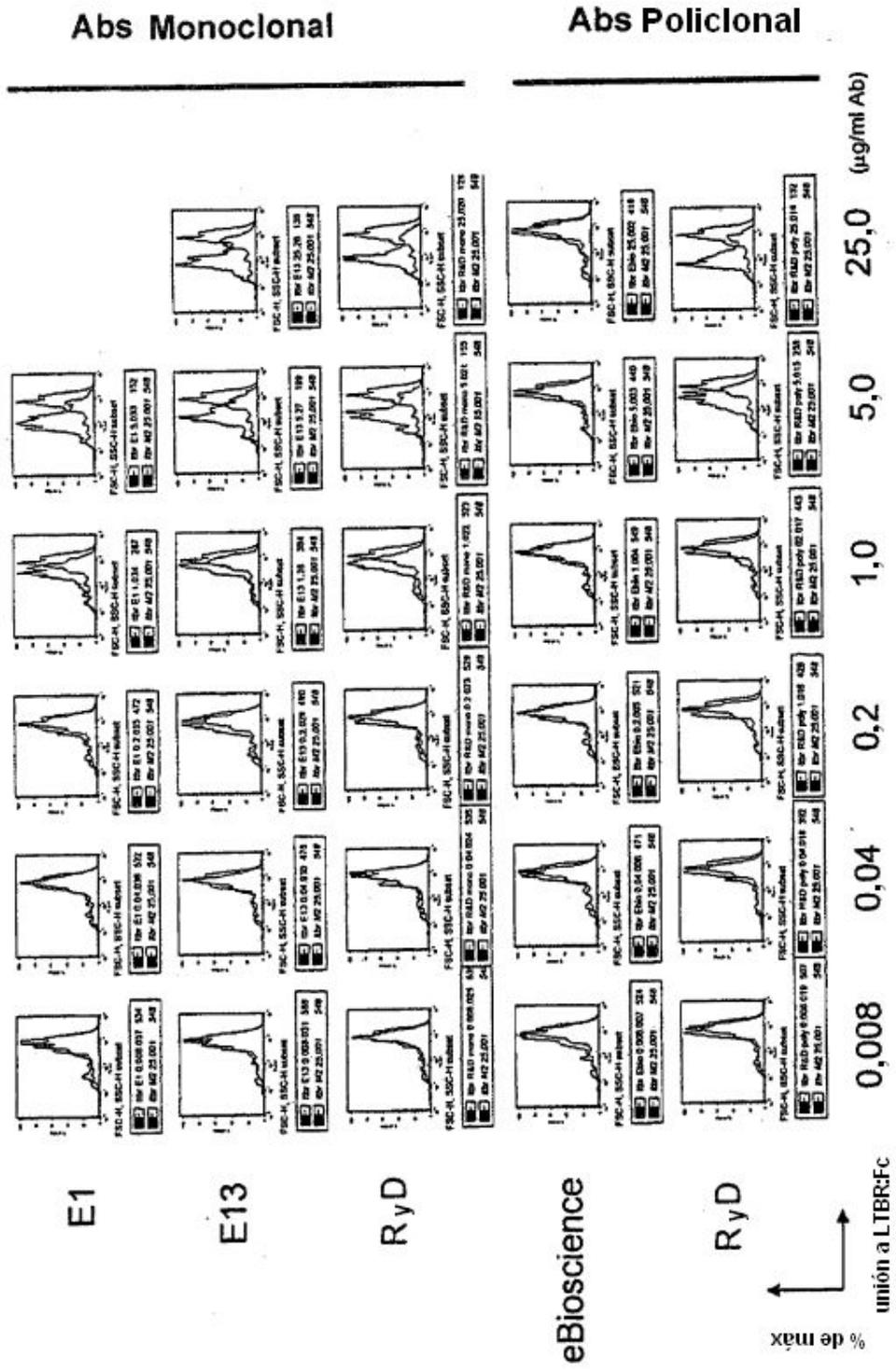


FIGURA 14

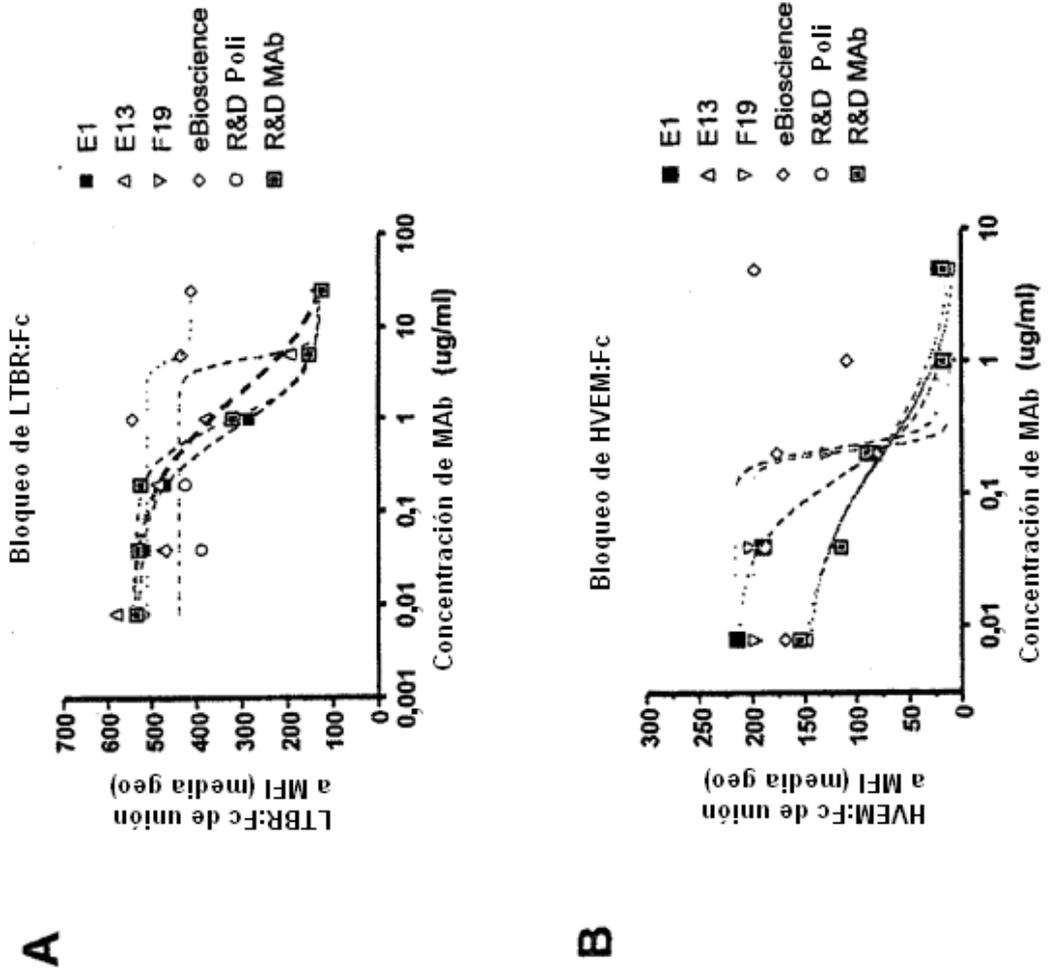


FIGURA 15

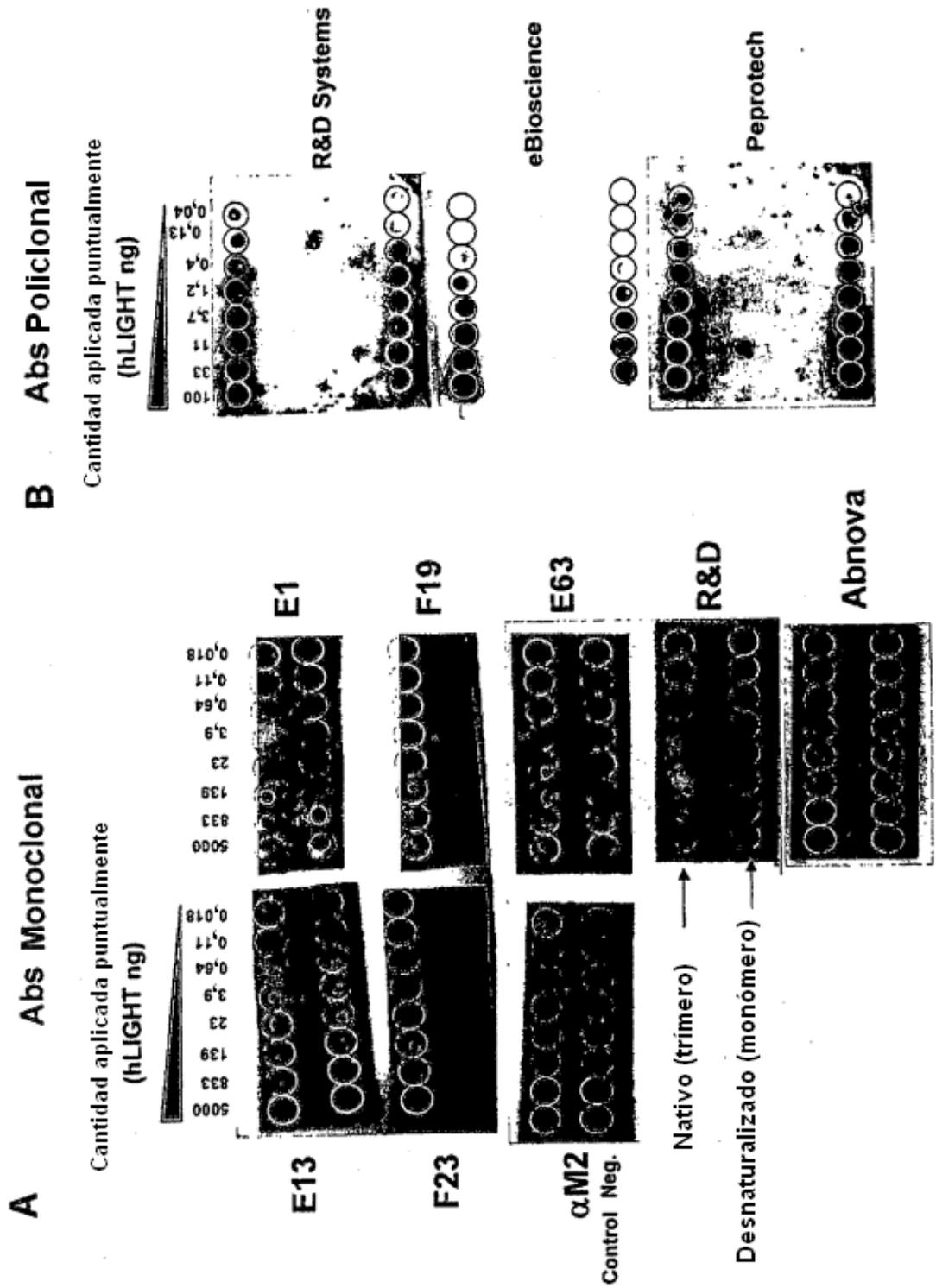


FIGURA 16

Anticuerpo	Trimero nativo *	Monómero desnaturalizado *
E1 (mAb humano)	23	139
E13 (mAb humano)	0,64	0,64
E63 (mAb humano)	3,9	139
F19 (mAb humano)	23	>5000
F23 (mAb humano)	23	>5000
Abnova (mAb de ratón)	0,64	0,64
R&D systems (mAb de ratón)	23	139
R&D systems (pAb de cabra)	0,04	0,13
eBiosciences (pAb de conejo)	0,4	1,2
Peprotech (pAb de conejo)	0,04	0,13

* Límite de detección (cant. más baja de LIGHT detectada (ng))

FIGURA 17

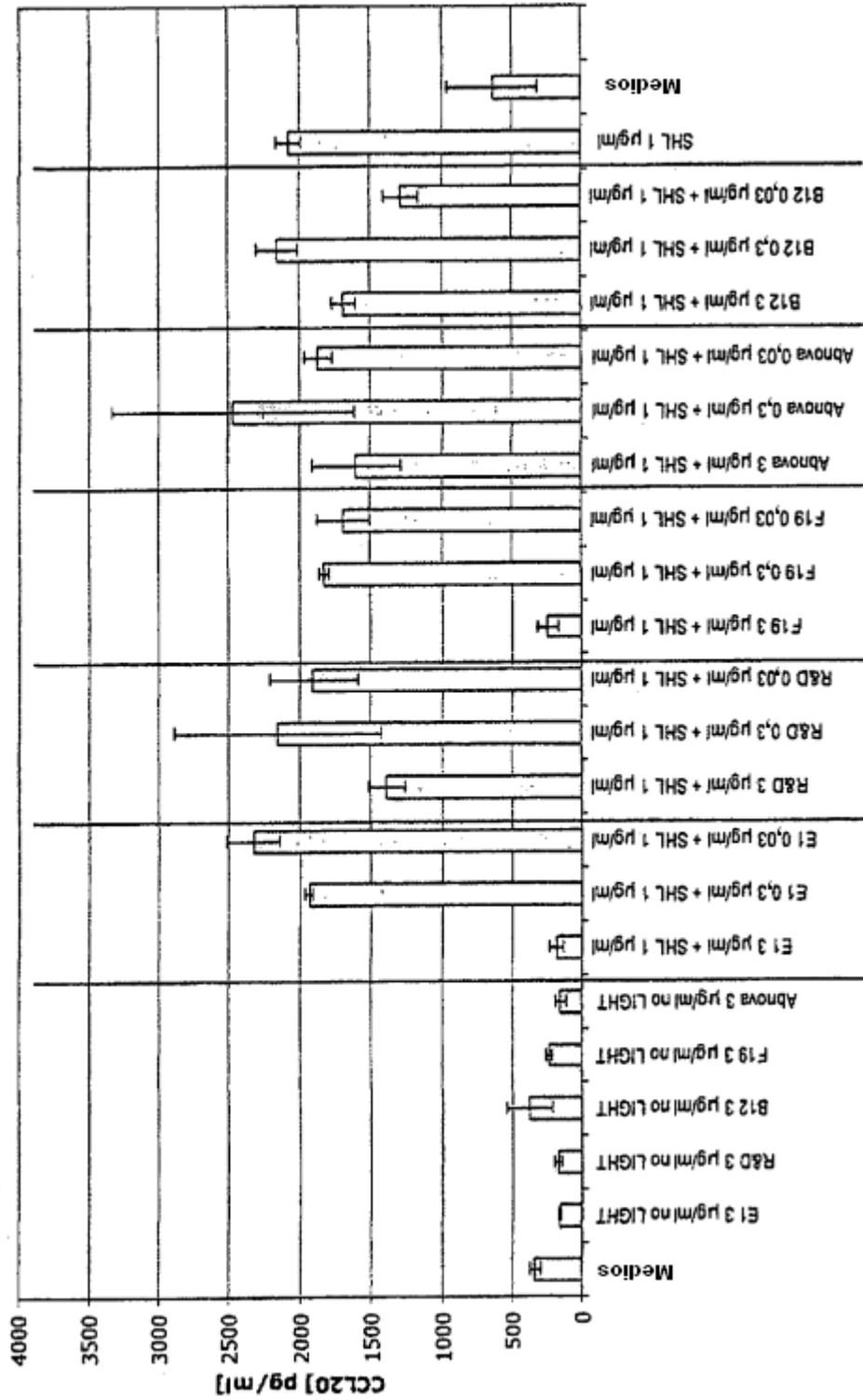


FIGURA 18

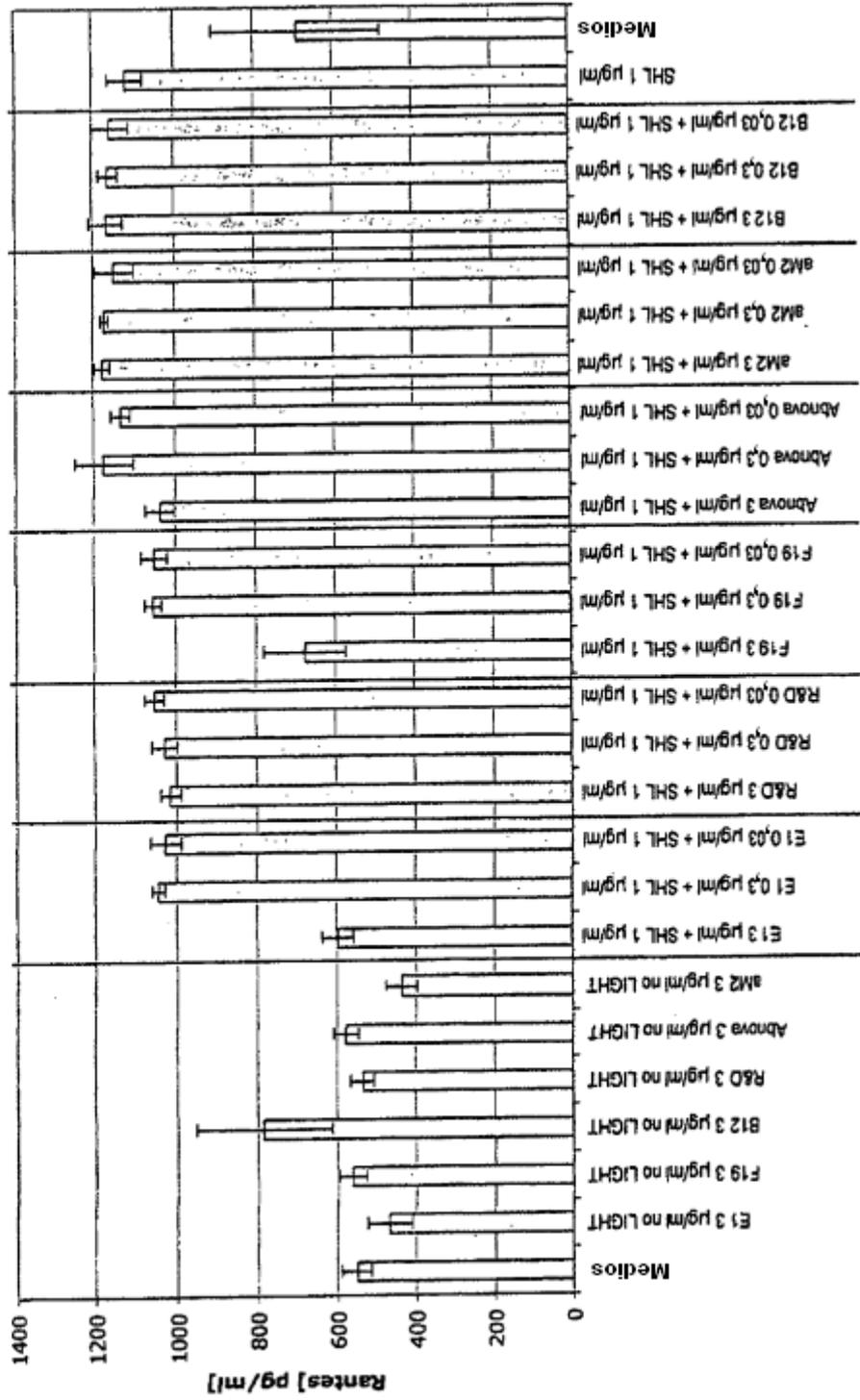


FIGURA 19

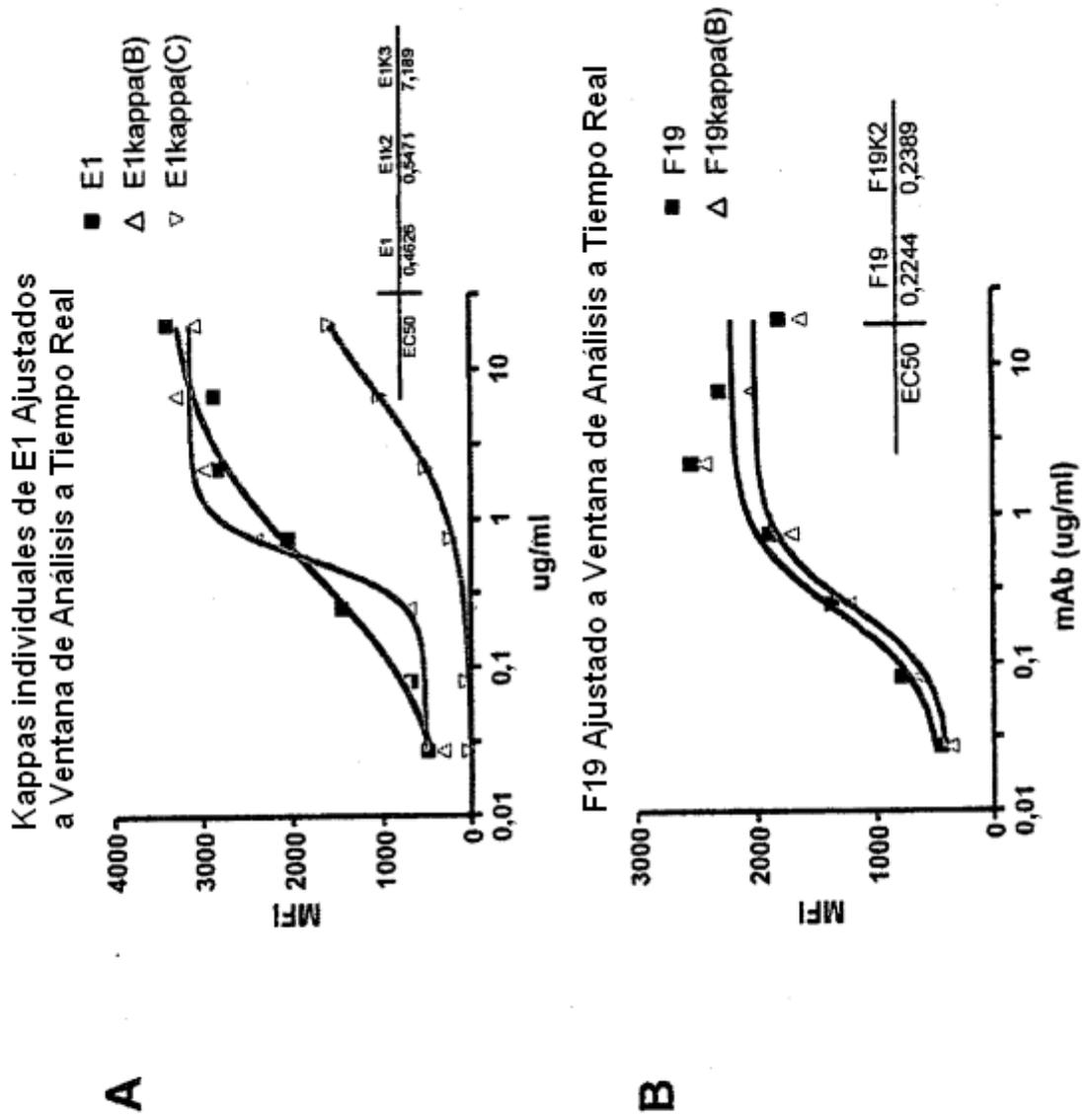


FIGURA 20

Ab Soluble	Ab revestido			
	E1	E1kappa(B)	F19	F19kappa(B)
E1	90	91	0	0
E1kappa(B)	92	92	0	0
F19	0	0	98	98
F19kappa(B)	0	24	98	98
AntiM2	0	0	0	0

FIGURA 21

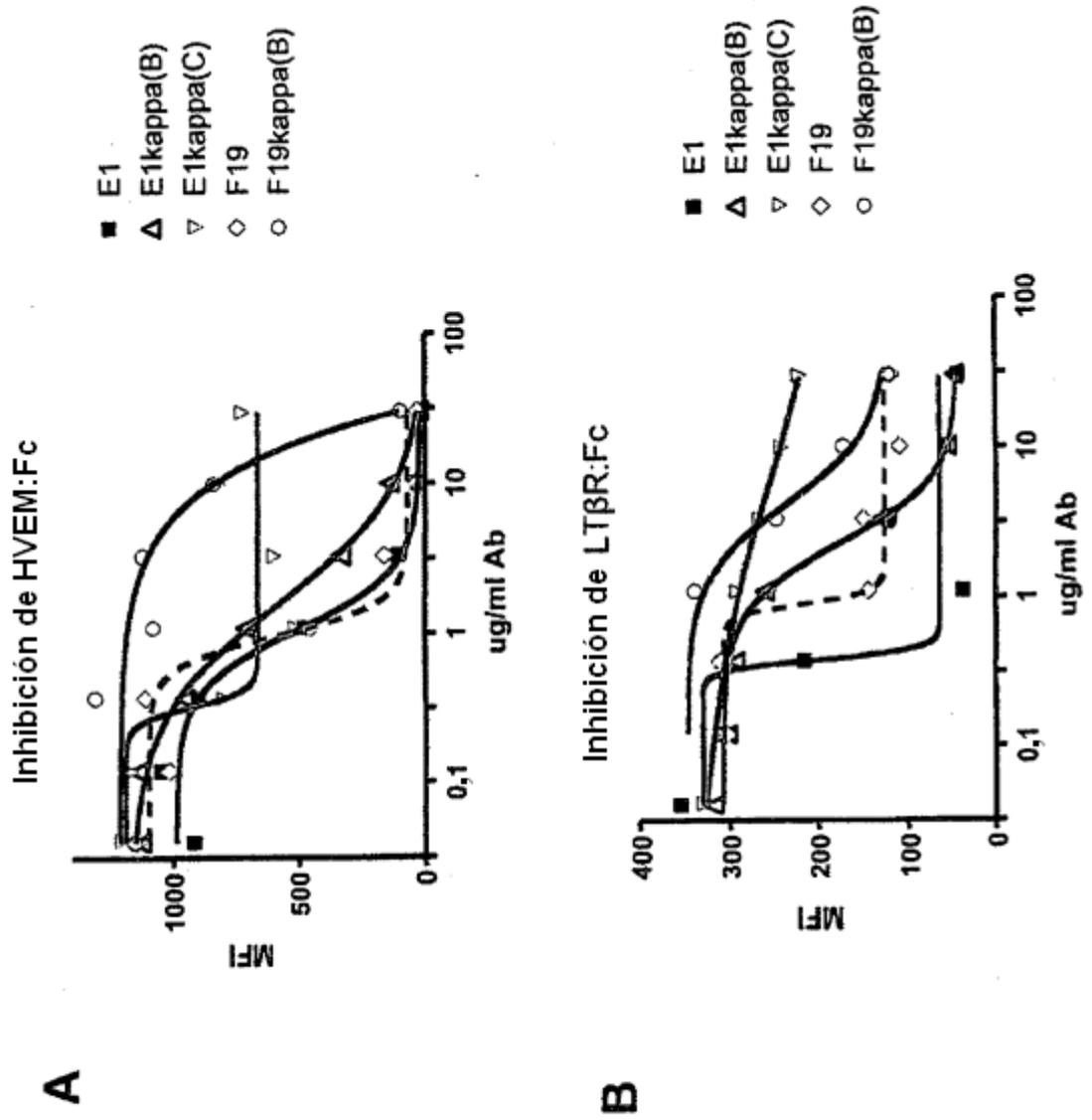


FIGURA 22

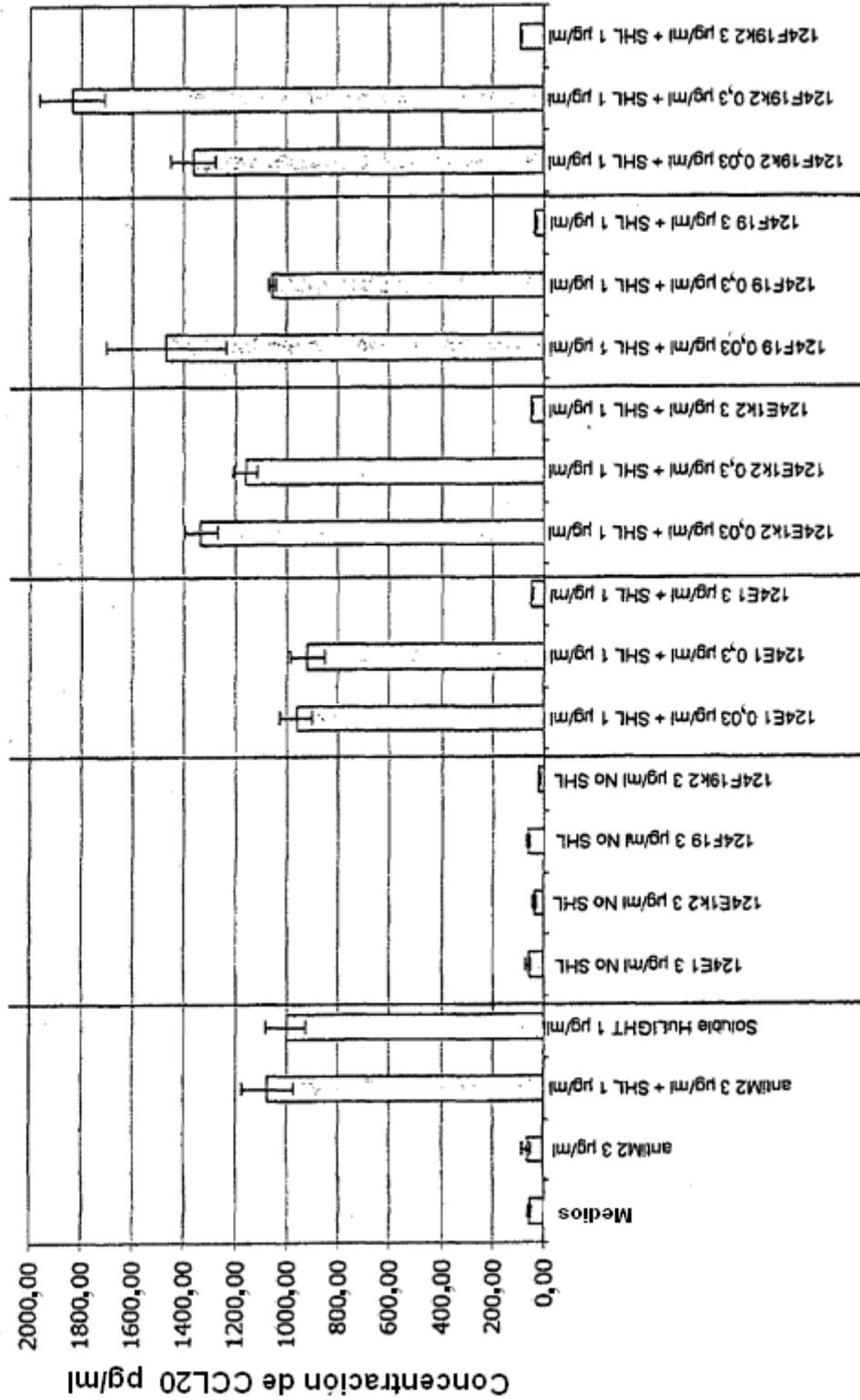


FIGURA 23

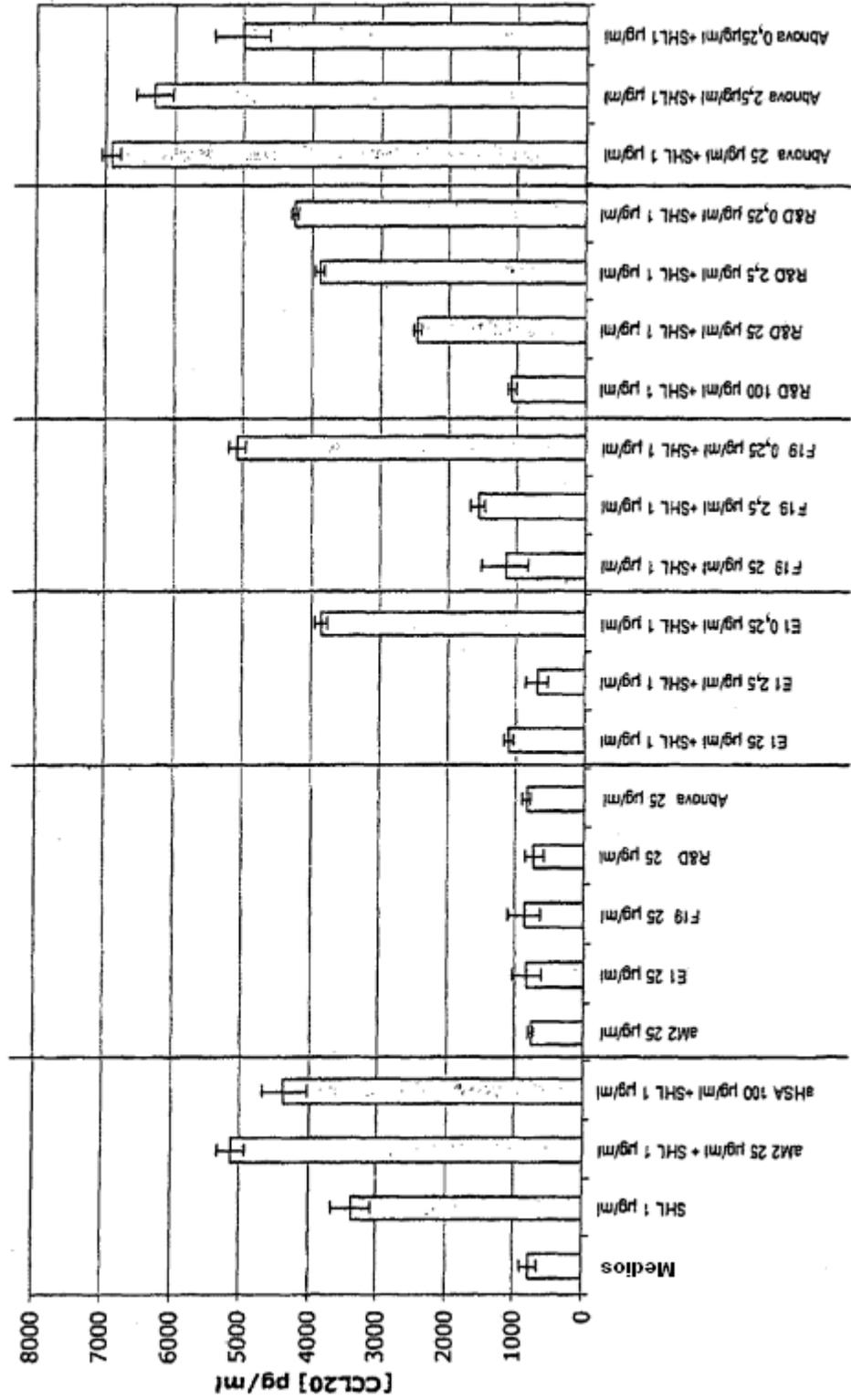


FIGURA 24

A. Extracelular: a.a. 214 **B.** Citoplasmático: a.a. 32

■ Diversidad de Población TNFSF14 SNP aa 214 Frecuencia Alelo

Población	Grupo Individual	A	G
WICGR8_asian_pooled		0.120	0.880
WICGR6_caucasian_pooled		0.020	0.980
CEPH		0.080	0.920
HapMap-CEU	Europeo	0.042	0.958
HapMap-HCB	Asiático	0.011	0.989
HapMap-JPT	Asiático	0.136	0.864
HapMap-YRI	Sub-Sahariano Africano	0.033	0.967
AGL ASP population	Afro Americano	0.050	0.950

Alelo dbSNP	Resto proteína	Pos aminoácido
G	GD	EA
A	LV	IS

■ Diversidad de Población TNFSF14 SNP aa 32 Frecuencia Alelo

Población	Grupo Individual	C	T
AFD EUR PANEL	Europeo	1.000	
AFD AFR PANEL	Afro Americano	1.000	
AFD CHN PANEL	Asiático	0.979	0.021
HapMap-CEU	Europeo	1.000	
HapMap-HCB	Asiático	0.989	0.011
HapMap-JPT	Asiático	1.000	
HapMap-YRI	Sub-Sahariano Africano	1.000	

Alelo dbSNP	Resto proteína	Pos aminoácido
C	GV	EL
	SV	IS

FIGURA 25

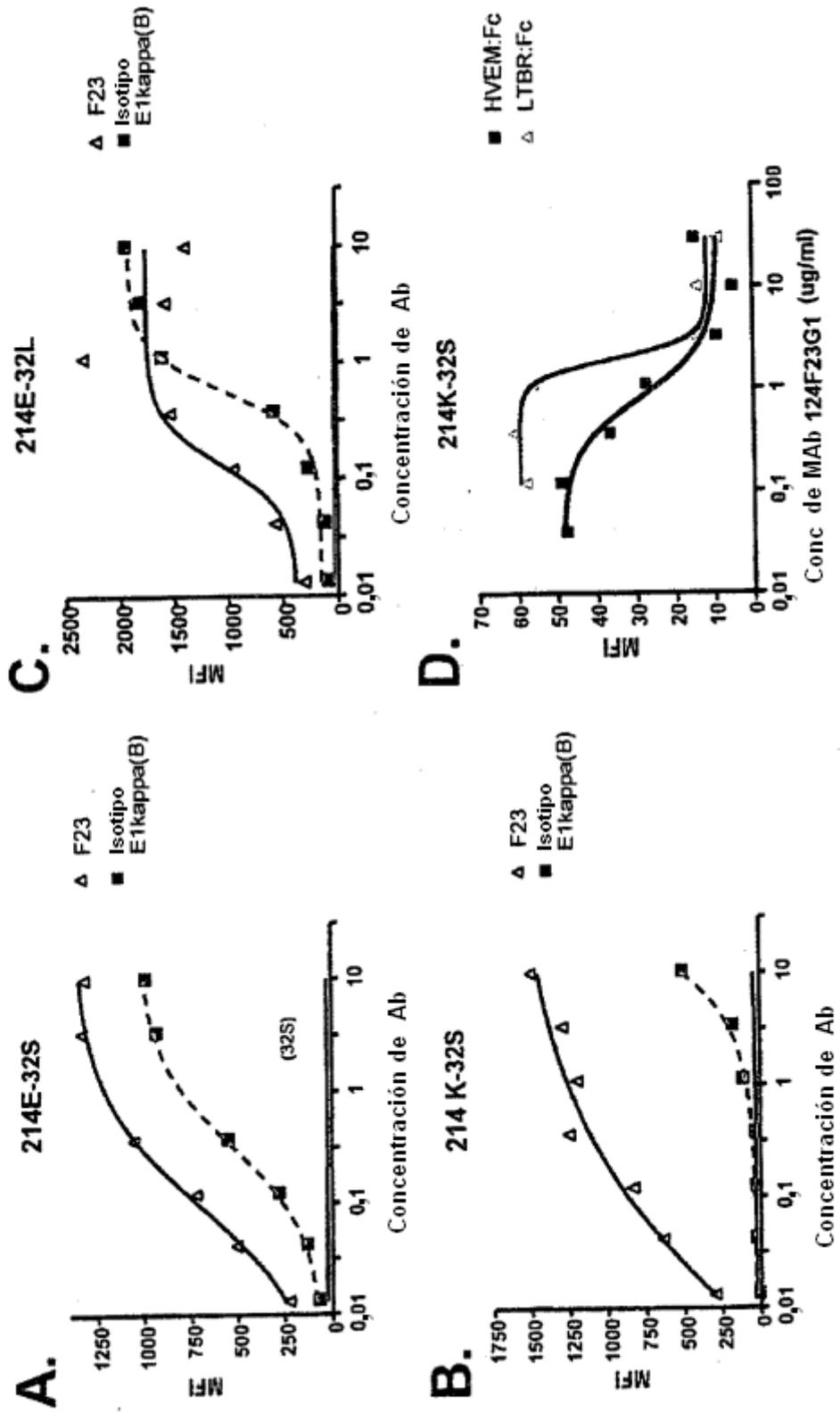


FIGURA 26

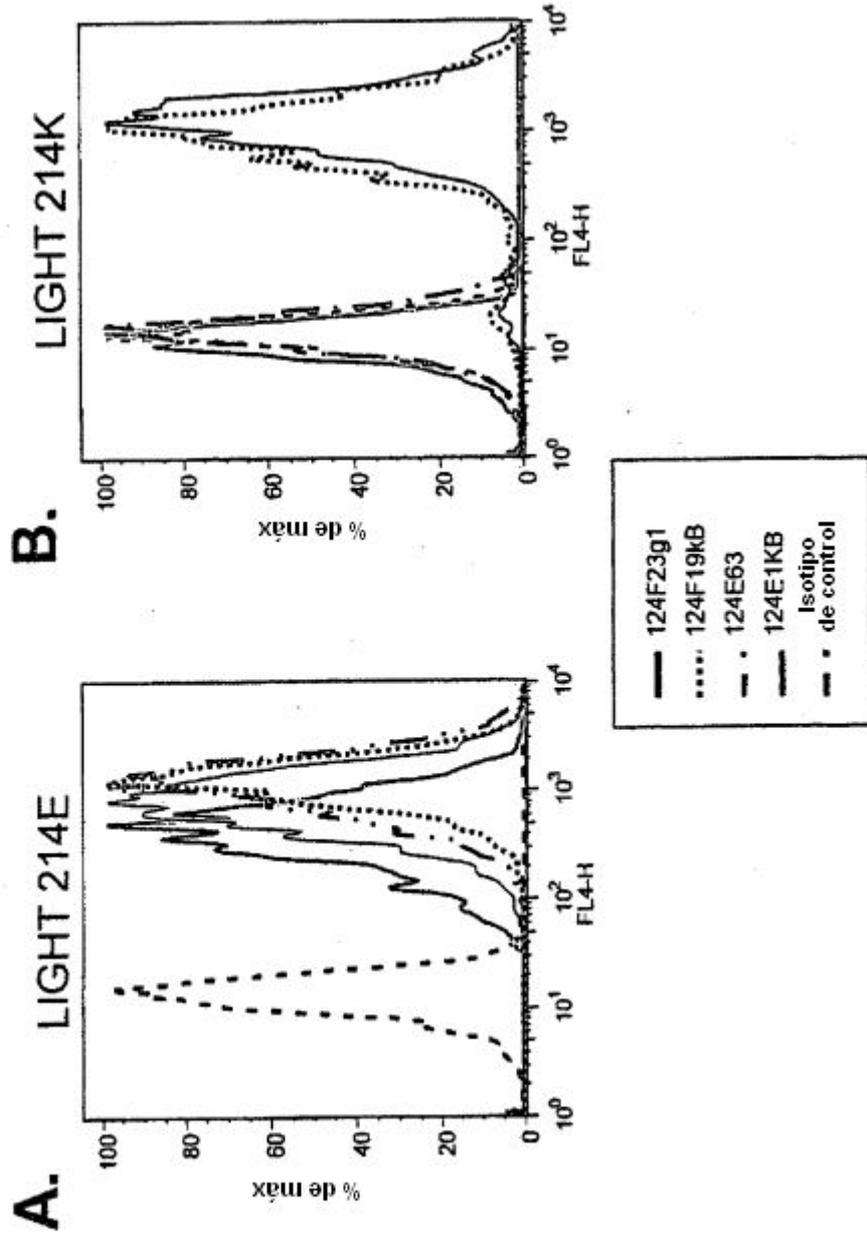


FIGURA 27

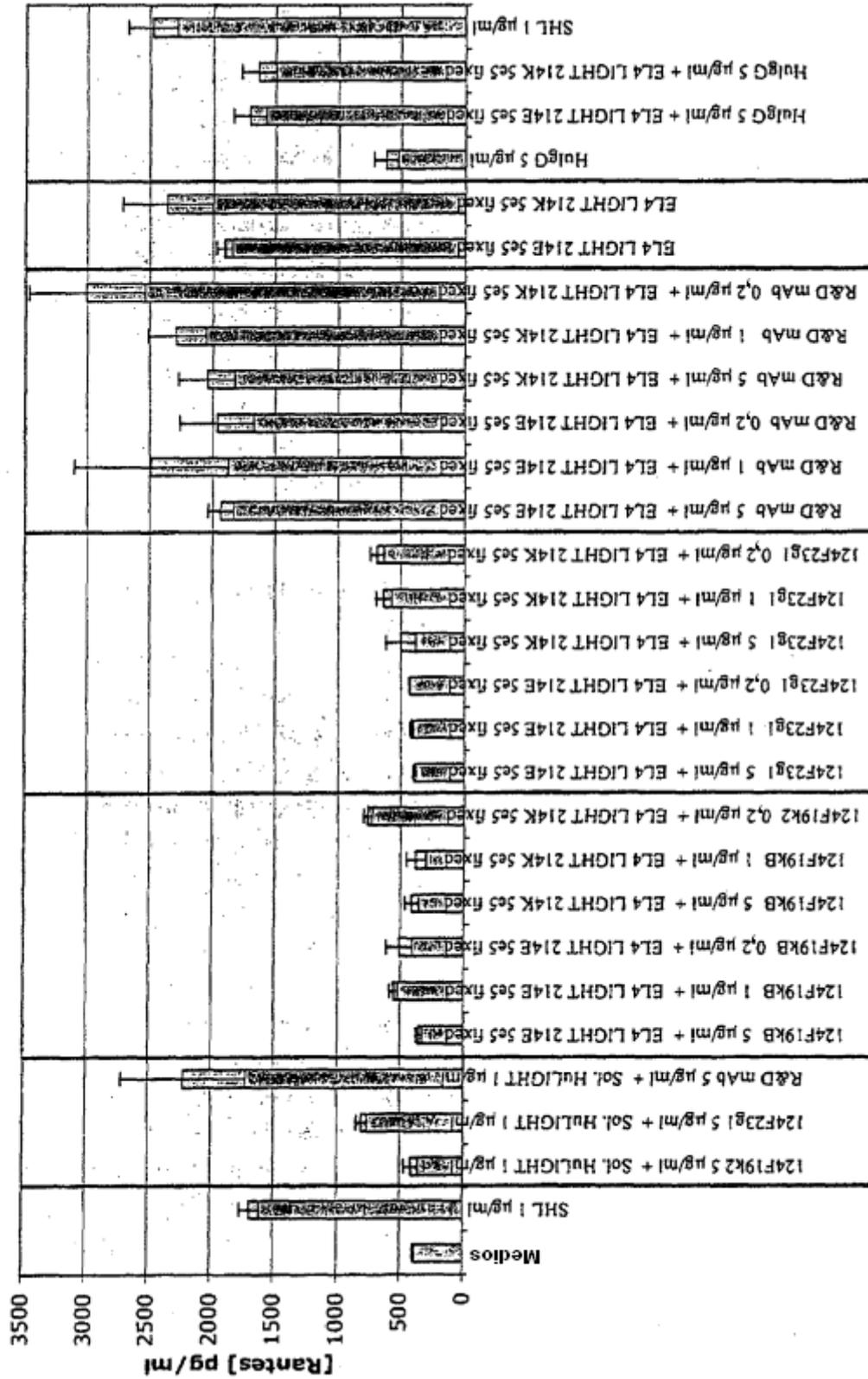


FIGURA 28

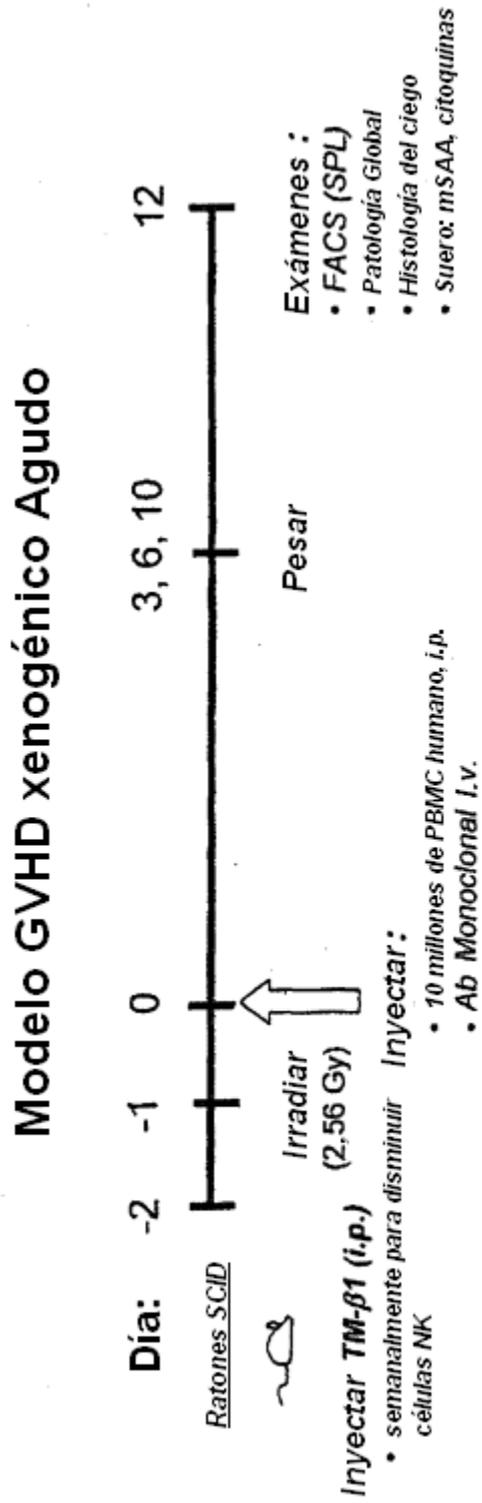


FIGURA 29

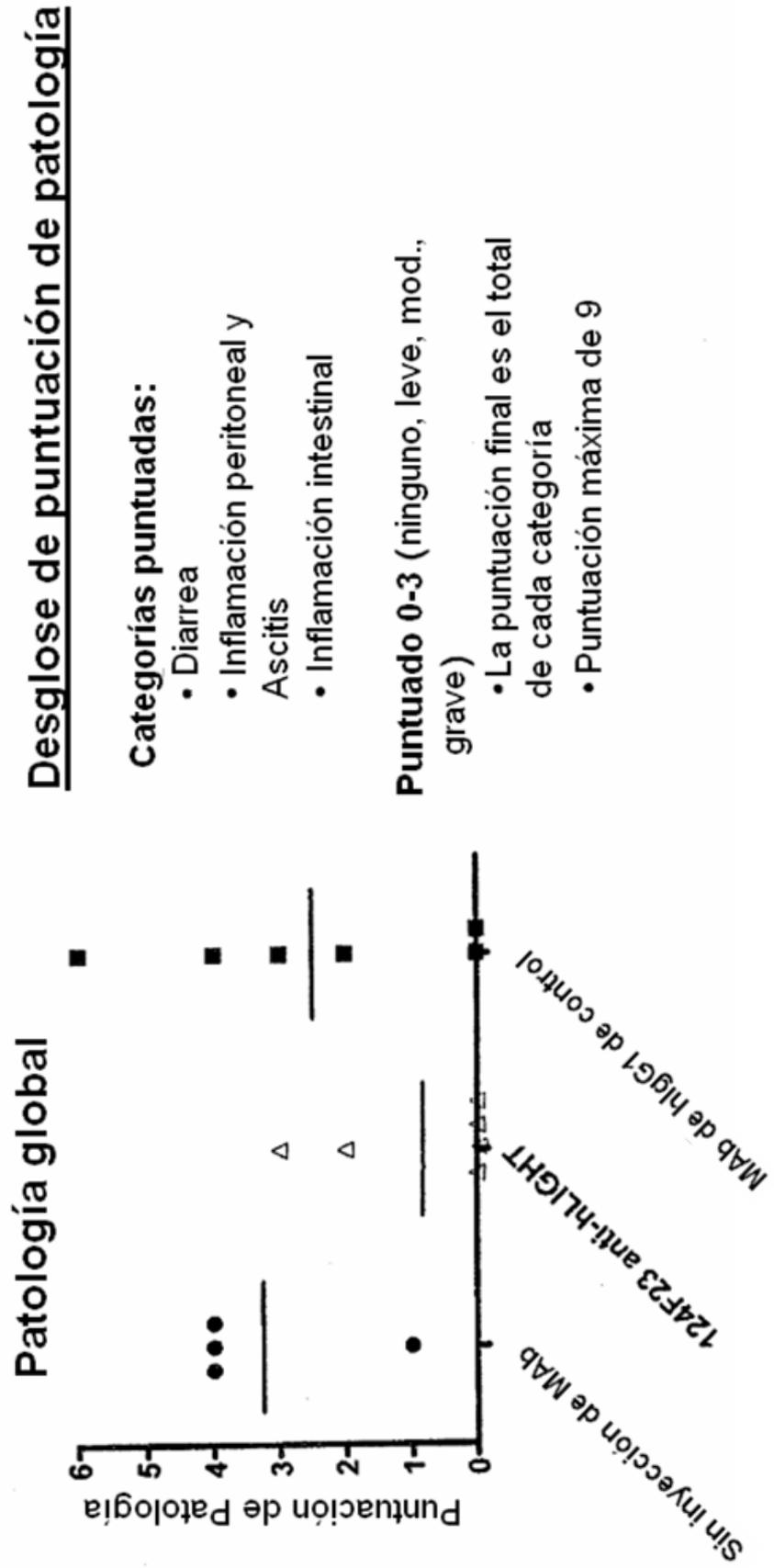


FIGURA 31

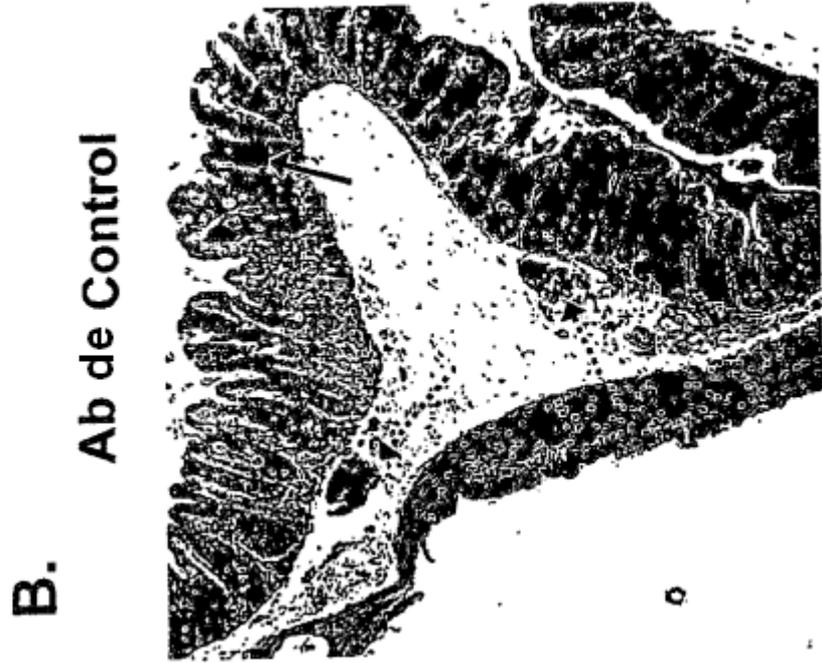
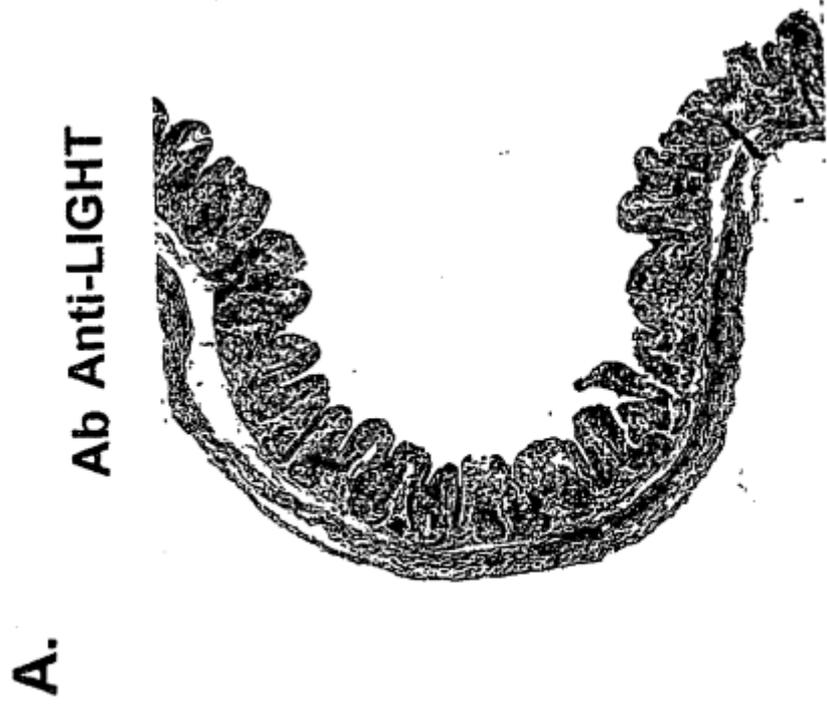


FIGURA 32

