

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 475**

51 Int. Cl.:

<b>C07K 16/28</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 37/02</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/705</b>	(2006.01)
<b>A01K 67/027</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2011 PCT/US2011/032355**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11130434**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2011 E 11730118 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2558498**

54 Título: **Anticuerpos que se unen a CD27 humana y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**04.04.2011 US 471459 P**  
**13.04.2010 US 323720 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.04.2017**

73 Titular/es:

**CELLDEX THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**  
**119 Fourth Avenue**  
**Needham, MA 02494-2725, US**

72 Inventor/es:

**KELER, TIBOR;**  
**MARSH, HENRY, C.;**  
**HE, LIZHEN;**  
**VITALE, LAURA, A. y**  
**THOMAS, LAWRENCE, J.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 608 475 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 que se unen a CD27 humana y usos de los mismos

5 **Antecedentes de la invención**

Las interacciones entre linfocitos T y células presentadoras de antígenos implican una variedad de moléculas accesorias que facilitan la generación de una respuesta inmunitaria. Una de esas moléculas es CD27, que se une a CD70 y pertenece a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNF-R) (Ranheim EA et al., Blood. 1995 June 15;85(12):3556-65). La CD27 normalmente existe como una proteína transmembranaria de tipo I glucosilada frecuentemente en forma de homodímeros con un puente disulfuro que une los dos monómeros. El puente disulfuro está en el dominio extracelular cerca de la membrana (Camerini et al., J Immunol. 147:3165-69 (1991). La CD27 también puede expresarse en una forma soluble (véase, por ejemplo, van Oers MH, et al., Blood. 1993 Dec 1;82(11):3430-6 y Loenen WA, et al., Eur. J. Immunol. 22:447, 1992). La reticulación del antígeno CD27 sobre linfocitos T proporciona una señal coestimuladora que, de común acuerdo con la reticulación del receptor de linfocitos T, puede inducir la proliferación de linfocitos T y la activación inmune celular.

La CD27 se expresa en timocitos maduros, en la mayoría de las linfocitos T de sangre periférica de CD4+ y CD8+, linfocitos citolíticos espontáneos y linfocitos B (Kobata T, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995 Nov 21;92(24):11249-53). La CD27 también está altamente expresada en linfomas no Hodgkin de linfocitos B y leucemias linfocítica crónicas de linfocitos B (Ranheim EA, et al., Blood. 1995 Jun 15;85(12):3556-65). Además, se han identificado niveles elevados de proteína CD27 soluble en suero o sitios de actividad de enfermedad en infección parasítica, infección por citomegalovirus (CMV), sarcoidosis, esclerosis múltiple y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (Loenen WA, et al., Eur. J. Immunol. 22:447, 1992).

SAKANISHI et al: "Anti-tumor effects of depleting and non-depleting anti-CD27 monoclonal antibodies in immune-competent mice" (BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 393, no. 4, 19 de marzo de 2010, páginas 829-835) informa de la generación de novedosos anticuerpos monoclonales supresores y no supresores contra de ratón, y caracterización de su actividad co-estimuladora *in vitro* y efectos antitumorales en ratones inmunocompetentes portadores de linfoma singénico de linfocitos T (EG7) que expresa o carece de CD27.

RAMAKRISHNA et al: "In vitro characterization of novel anti-CD27 humana mAbs" (JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 184, 1 de abril de 2010, página 87.23) informa de la caracterización *in vitro* de diversos anticuerpos anti-CD27 humana, que incluyen su unión a diversos tipos de células y que bloquean la unión a CD70 soluble.

Se ha demostrado recientemente que los anticuerpos monoclonales agonistas contra CD27 promueven respuestas de linfocitos T y prometen como terapéuticos contra el cáncer (véase, por ejemplo, T, et al., Biochem Biophys. Res. Commun. 2010 Feb 18 y el documento WO 2008/051424). Sin embargo, mientras que los resultados obtenidos hasta la fecha establecen que la CD27 es una diana útil para inmunoterapia, no se sabe qué características particulares de los anticuerpos monoclonales anti-CD27 son especialmente ventajosas para fines terapéuticos. Como tal, existe una necesidad en la técnica de una mayor percepción sobre las propiedades funcionales específicas que hacen que los anticuerpos anti-CD27 sean terapéuticamente eficaces, además de anticuerpos terapéuticos mejorados contra CD27 que sean más eficaces para tratar y/o prevenir enfermedades.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona, entre otras cosas, anticuerpos anti-CD27 aislados que tienen propiedades funcionales particulares que pueden unirse a efectos terapéuticos ventajosos y deseables. En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal aislado que se une a CD27 humana e induce o mejora una respuesta inmunitaria de linfocitos T, en la que el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 38, una región variable de la cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 39, una región variable de la cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 40, una región variable de la cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 44, una región variable de la cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 45 y una región variable de la cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 46. Específicamente, se han generado y caracterizado mediante la presente invención anticuerpos monoclonales anti-CD27 capaces de regular por incremento las respuestas inmunitarias de linfocitos T (por ejemplo, como se demuestra por la inducción o mejora de respuestas de linfocitos T específicas de antígeno) que son particularmente adecuadas para la combinación con terapias de vacuna. En una realización, los anticuerpos anti-CD27 agonistas pueden mejorar la respuesta inmunitaria contra cánceres o enfermedades infecciosas mediante combinación con vacunación activa o mediante la mejora de las respuestas inmunitarias endógenas. Tales anticuerpos también pueden inducir, directa o indirectamente, la expresión de citocinas. Además, se han generado y caracterizado anticuerpos anti-CD27 que regulan por disminución las respuestas inmunitarias de linfocitos T, que son particularmente adecuadas para tratar trastornos inmunitarios, tales como rechazo de injerto, alergia y enfermedades autoinmunitarias. Aún más, se han generado y caracterizado anticuerpos anti-CD27 que inhiben el crecimiento de células que expresan CD27 mediante mecanismos directos de destrucción celular (por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDCC)), que son particularmente

eficaces en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades que implican la proliferación celular (por ejemplo, cánceres).

En una realización, los anticuerpos anti-CD27 de la presente invención presentan una o más de las siguientes propiedades:

- (a) bloquean la unión de sCD70 a CD27 al menos aproximadamente el 70 % a una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml;
- (b) se unen a CD27 humana con una constante de disociación en equilibrio  $K_d$  de  $10^{-9}$  M o menos o, alternativamente, una constante de asociación en equilibrio  $K_a$  de  $10^{+9}$   $M^{-1}$  o mayor;
- (c) inducen citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) específica de células que expresan CD27 al menos el 10 % a una concentración de anticuerpo de 3 µg/ml y aproximadamente el 6 % de complemento de suero de conejo;
- (d) inducen lisis específica de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) de células que expresan CD27 al menos el 10 % a una concentración de anticuerpo de 3 µg/ml y relación de células efectoras:diana de 75:1;
- (e) mejoran la mediana de la supervivencia al menos el 20 % en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) después de la inoculación con células tumorales *in vivo* ( $5 \times 10^5$  células Raji o  $1 \times 10^6$  células Daudi) cuando se administran a 0,3 mg (i.p.) al menos dos veces a la semana durante 3 semanas en comparación con los ratones a los que no se les administra anticuerpo;
- (f) inducen o mejoran respuestas inmunitarias específicas de antígeno en combinación con una vacuna o antígeno endógeno;
- (g) inducen o mejoran respuestas inmunitarias TH1 específicas de antígeno en combinación con una vacuna o antígeno endógeno;
- (h) inducen o mejoran la proliferación o activación de linfocitos T específicos de antígeno en combinación con una vacuna o antígeno endógeno;
- (i) reducen o inhiben la proliferación o activación de linfocitos T;
- (j) inducen o mejoran la actividad de linfocitos T cuando se combina con activación simultánea, separada o consecutiva de TCR;
- (k) bloquean la unión de sCD70 a CD27 al menos aproximadamente el 70 % a una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml y reducen o inhiben la actividad de linfocitos T cuando no son capaces de unirse a receptores Fc o que tienen unión reducida a los mismos;
- (l) producen menos del 50 % de reducción de linfocitos T CD3+ (distintos de NK) en macacos cuando se administran a 3 mg/kg (i.v.) durante el período de 29 días inmediatamente tras la administración o
- (m) producen menos del 50 % de reducción de linfocitos B de memoria en macacos cuando se administran a 3 mg/kg (i.v.) durante el período de 29 días inmediatamente tras la administración.

En una realización particular, los anticuerpos de la invención presentan combinaciones de estas propiedades funcionales.

Por consiguiente, en un aspecto, los anticuerpos anti-CD27 de esa invención inducen y/o mejoran una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria de linfocitos T). En una realización adicional, los anticuerpos inhiben la unión de CD70 a CD27 en las células. Anticuerpos particulares que tienen estas combinaciones de propiedades incluyen mAb 1F5 que comprenden secuencias de regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden SEQ ID NOs: 37 y/o 43, respectivamente). Alternativamente, los anticuerpos descritos en el presente documento no inhiben la unión de CD70 a CD27 en las células. Anticuerpos particulares que tienen estas combinaciones de propiedades incluyen mAb 3H8 que comprenden secuencias de regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden SEQ ID NOs: 7 y/o 13, respectivamente o 7 y/o 19, respectivamente). Tales anticuerpos anti-CD27 también pueden unirse a una segunda molécula (por ejemplo, como una molécula biespecífica) que tiene una especificidad de unión que es diferente de la del anticuerpo, tal como un receptor de linfocitos T (por ejemplo, CD3, CD25, CD137, CD154) o un receptor Fc (por ejemplo, FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB1 (CD32), FcγRIIB2 (CD32), FcγRIIIA (CD16a), FcγRIIIB (CD16b), FcεRI, FcεRII (CD23), FcαRI (CD89), Fcα/μR y FcRn) o un receptor de NK (por ejemplo, CD56) o un receptor de linfocitos B (por ejemplo, CD19, CD20).

Anticuerpos previstos para ser usado para la inducción o mejoramiento de respuestas inmunitarias según la presente invención pueden tener un dominio funcional Fc que permite la unión a receptores Fc, y pueden incluir un dominio Fc mutado que tiene niveles elevados de unión a los receptores Fc.

En otro aspecto, los anticuerpos anti-CD27 de la invención regulan por disminución las respuestas inmunitarias de linfocitos T inhibiendo la unión de CD27 a CD70 en células que expresan estas proteínas. En una realización particular, los anticuerpos inhiben la unión de CD70 soluble (sCD70) a CD27 que expresan células al menos aproximadamente el 70 %. Anticuerpos particulares que se encuentran dentro de esta clase incluyen, por ejemplo, mAb que comprenden secuencias de regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden SEQ ID NOs:37 y/o 43 (mAb 1F5). Otros anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, mAb que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden SEQ ID NOs: 49 y/o 55 (mAb 1H8), o SEQ ID NOs: 103 y/o 109 (mAb 3H12).

En otro aspecto más, los anticuerpos anti-CD27 de la invención inducen o mejoran la función de célula efectora (por ejemplo, destrucción celular mediante tanto ADCC y/o CDC). En una realización, el anticuerpo induce al menos aproximadamente el 30 % de lisis específica de células que expresan CD27 mediante ADCC a una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml y/o induce al menos aproximadamente el 30 % de CDC de células que expresan CD27 a una concentración de 10 µg/ml. Anticuerpos particulares que se encuentran en esta clase que presentan función efectora de ADCC incluyen, por ejemplo, mAb que comprende secuencias de la región variable de cadena pesada y/o ligera que comprenden SEQ ID NOs: 37 y/o 43 (mAb 1F5). Otros anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, mAb que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y/o ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 61 y/o 67 (mAb 1G5), SEQ ID NOs: 85 y/o 91, 85 y/o 97 (mAb 3A10), SEQ ID NOs: 7 y/o 13, 7 y/o 19 (mAb 3H8), SEQ ID NOs: 49 y/o 55 (mAb 1H8), o SEQ ID NOs: 103 y/o 109 (mAb 3H12). En una realización adicional, el anticuerpo también inhibe la unión de CD70 a CD27 en las células. Anticuerpos particulares que tienen estas combinaciones de funciones incluyen, por ejemplo, mAb que comprenden secuencias de regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 37 y/o 43 (mAb 1F5). Otros anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, por ejemplo, mAb que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden SEQ ID NOs: 49 y/o 55 (mAb 1H8), SEQ ID NOs: 103 y/o 109 (mAb 3H12). Alternativamente, el anticuerpo descrito en el presente documento induce ADCC y/o CDC como se ha descrito anteriormente, pero no inhibe la unión de CD70 a CD27 en las células. Anticuerpos particulares descritos que tienen estas características incluyen, por ejemplo, mAb que comprende secuencias de la región variable de cadena pesada y/o ligera que comprenden SEQ ID NOs: 61 y/o 67 (mAb 1G5), SEQ ID NOs: 85 y/o 91, 85 y/o 97 (mAb 3A10), SEQ ID NOs: 7 y/o 13, 7 y/o 19 (mAb 3H8).

También pueden construir anticuerpos anti-CD27 capaces de inducir o mejorar la función de célula efectora (por ejemplo, ADCC y/o CDC) para incluir una región Fc que contribuye adecuadamente a la especificidad de unión por un receptor Fc específico (por ejemplo, FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32), FcγRIIB (CD32), FcγRIIB2 (CD32), FcγRIIIA (CD16a), FcγRIIIB (CD16b), FcεRI, FcεRII (CD23), FcαRI (CD89), Fcα/μR y FcRn).

La presente invención también proporciona el anticuerpo de la invención para su uso en un método de tratamiento de un cáncer seleccionado de leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, eritroleucemia monocítica mielomonocítica promielocítica de mieloblastos, leucemia crónica, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células del manto, linfoma del sistema nervioso central primario, linfoma de Burkitt, linfoma de linfocitos B de la zona marginal, linfoma policitemia vera, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de las cadenas pesadas, tumores sólidos, sarcomas y carcinomas, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, sarcoma de colon, carcinoma colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón no de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma esofágico, carcinoma de células basales, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro y sistema nervioso central (SNC), cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cánceres colorrectales, cáncer de tejido conjuntivo, cáncer del aparato digestivo, cáncer endometrial, cáncer de esófago, cáncer de ojo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, neoplasia intraepitelial, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (de células pequeñas, de células grandes), melanoma, neuroblastoma; cáncer de cavidad bucal (por ejemplo, labios, lengua, boca y faringe), cáncer de ovarios, cáncer pancreático, retinoblastoma, rhabdomiomasarcoma, cáncer rectal; cáncer del aparato respiratorio, sarcoma, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer uterino y cáncer del aparato urinario. Se describe en el presente documento un método para mejorar una respuesta inmunitaria contra un antígeno en un sujeto en necesidad del mismo administrando al sujeto: i) un anticuerpo anti-CD27 y ii) un antígeno, en el que el anticuerpo anti-CD27 se administra por separado de y antes de administrar el antígeno.

Normalmente, en un método tal, el anticuerpo anti-CD27 puede administrarse entre al menos 2 y 96 horas antes del antígeno. Por ejemplo, en un método tal, el anticuerpo anti-CD27 puede administrarse al menos 2 horas antes del antígeno, por ejemplo, al menos 12 horas antes del antígeno, adecuadamente al menos 24 horas antes del antígeno, al menos 48 horas antes del antígeno o al menos 72 horas antes del antígeno, en el que el agonista de TLR es un agonista de TLR3.

También se describe un método de mejoramiento de una respuesta inmunitaria contra un antígeno en un sujeto en necesidad del mismo administrando simultáneamente, por separado o secuencialmente al sujeto: i) un anticuerpo anti-CD27; ii) un agonista de TLR; y iii) opcionalmente, el antígeno.

En un caso preferido de un método tal, el agonista de TLR es un agonista de TLR3, por ejemplo, pero no se limita a, Poly IC:LC.

Las células que expresan CD27 incluyen todas y cada una de las células que expresan CD27, que incluyen, pero no se limitan a, linfocitos B, linfocitos NK y linfocitos T. En un caso particular, las células que expresan CD27 incluyen líneas celulares de cáncer tales como células Jurkat, células Raji, células Ramos y células Daudi. En otro caso, las células que expresan CD27 son células tumorales o células cancerosas. En otro caso, las células que expresan CD27 incluyen linfocitos B, linfocitos NK y linfocitos T que incluyen linfocitos T que se encuentran infiltrando tumores, también denominados linfocitos infiltrantes de tumores.

Anticuerpos particulares descritos en el presente documento comprenden regiones variables de cadena pesada y ligera que utilizan líneas germinales humanas particulares, es decir, están codificados por los genes de líneas germinales, pero incluyen reordenaciones y mutaciones genéticas, por ejemplo, mutaciones somáticas, que se producen durante la maduración de anticuerpos. En un caso, la región variable de cadena pesada de los anticuerpos deriva de un gen 3-7 o 3-33 de la línea germinal humana. En otros casos, la región variable de cadena ligera del anticuerpo deriva de un gen 3-20, 3-11, 24, 1D-16 o 1-13 de la línea germinal humana. En una realización particular, la región variable de cadena pesada del anticuerpo deriva de un gen  $V_H$  3-7 o  $V_H$  3-33 de la línea germinal humana y la región variable de cadena ligera del anticuerpo deriva de un gen  $V_K$  3-20,  $V_K$  3-11,  $V_K$  1D-16 o  $V_K$  1-13 de la línea germinal humana.

Una secuencia de línea germinal  $V_H$  3-33 se proporciona (N.º de acceso de Genbank AAP44382) de la siguiente manera:

```
1 vqlvesgggv vqpgsrlls caasgftfst ygmhwvrrqap gkglewvaih wfdgsntyya
61 dsvrgrftis rdssrktlyl emkslrvedt avyycaak (SEQ ID NO: 3)
```

Una secuencia de línea germinal  $V_H$  3-7 se proporciona (N.º de acceso de Genbank AAP44389) de la siguiente manera:

```
1 vqlvesgggl vqpggsrlls caasgftfsn sytmwvrrqap gkglewvahi kpdgsdknyi
61 nsvrgrftis rdnaekssyl qmnsraedt aiyycvv (SEQ ID NO:4)
```

En otro caso, la secuencia de región variable de cadena pesada CDR3 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 10, 28, 40, 52, 64, 76, 88, 106 y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas (por ejemplo, sustituciones conservativas de aminoácidos). Los anticuerpos pueden incluir además una secuencia de región variable de cadena ligera CDR3 seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 16, 22, 34, 46, 58, 70, 82, 94, 100, 112 y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas. En otro caso, las secuencias de cadena pesada CDR2 y CDR1 se seleccionan de SEQ ID NOs: 9, 27, 39, 51, 63, 75, 87, 105 y SEQ ID NOs: 8, 26, 38, 50, 62, 74, 86, 104, respectivamente, y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas. Las secuencias de cadena ligera CDR2 y CDR1 se seleccionan de SEQ ID NOs: 15, 21, 33, 45, 57, 69, 81, 93, 99, 111 y SEQ ID NOs: 14, 20, 32, 44, 56, 68, 80, 92, 98, 110, respectivamente, y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas.

En otra realización adicional, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une a CD27 e incluye

- una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 38;
- una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 39;
- una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 40;
- una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 44;
- una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 45; y
- una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 46.

También se describe en el presente documento un anticuerpo aislado que se une CD27 e incluye secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 variables de cadena pesada y ligera seleccionadas del grupo que consiste en:

- (i) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 50;
- una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 51;
- una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 52;
- una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 56;
- una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 57;
- una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 58; o modificaciones de secuencia conservativas de la misma;

- (ii) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 104;
- una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 105;
- una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 106;

una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 110;  
 una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 111;  
 una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 112; o modificaciones de  
 secuencia conservativas de la misma;

5  
 (iii) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 86;  
 una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 87;  
 una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 88;  
 una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 92 o 98;  
 10 una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 93 o 99;  
 una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 94 o 100;  
 o modificaciones de secuencia conservativas de la misma;

15 (iv) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 26;  
 una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 27;  
 una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 28;  
 una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 32;  
 una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 33;  
 20 una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 34; o modificaciones de secuencia  
 conservativas de la misma;

(v) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 74;  
 una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 75;  
 una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 76;  
 25 una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 80;  
 una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 81;  
 una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 82; o modificaciones de secuencia  
 conservativas de la misma;

30 (vi) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 8;  
 una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 9;  
 una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 10;  
 una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 14 o 20;  
 una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 15 o 21;  
 35 una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 16 o 22;  
 o modificaciones de secuencia conservativas de la misma; y

(vii) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 62;  
 una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 63;  
 40 una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 64;  
 una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 68;  
 una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 69;  
 una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 70; o modificaciones de secuencia  
 conservativas de la misma.

45 En otro caso, la secuencia de región variable de cadena pesada CDR3 comprende una secuencia de aminoácidos  
 seleccionada de la secuencia consenso: R (G,E,D) (S,L,G,-) (G,L,T,W, -) (N,A,T,H,-) (V,T,-) (M,P,-) (G,V,-) (R, -)  
 (G,M, -) (D,H,L,T,W) (A,G,N,W) (D,F,V,Y) (F,L) (D,E) (H,I,L,Y) (SEQ ID NO: 113), en las que "-" indica la opción de  
 50 que no esté presente resto de aminoácido en esa posición consenso. Los anticuerpos pueden incluir además una  
 secuencia de región variable de cadena ligera CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada  
 de la secuencia consenso: Q (F,R,Y) (N,S) (N,T,S) (Y,W) P (F,L,P,R) T (SEQ ID NO: 114), en las que "-" indica la  
 opción de que no esté presente resto de aminoácido en esa posición consenso. En otro caso, la secuencia de región  
 55 variable de cadena pesada CDR2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia  
 consenso: I (K,W) (Y,N,Q) D G S (E,N) (K,Q) (SEQ ID NO: 115), en las que "-" indica la opción de que no esté  
 presente resto de aminoácido en esa posición consenso, y la secuencia de región variable de cadena ligera CDR2  
 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia consenso: (A,D) A S (SEQ ID NO: 116). En  
 otro caso, la secuencia de región variable de cadena pesada CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos  
 60 seleccionada de la secuencia consenso: G F (T,S) (F,L) (S,N) (I,S,H) (Y,H) (SEQ ID NO: 117); y la secuencia de  
 región variable de cadena ligera CDR1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de la secuencia  
 consenso: Q (D,G,S) (I,V) (D,S) (R,S) (A,W,Y) (SEQ ID NO: 118).

65 En otro caso, anticuerpos aislados descritos en el presente documento se unen a CD27 humana e incluyen una  
 región variable de cadena pesada que incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste  
 en SEQ ID NOs: 6, 7, 24, 25, 36, 37, 48, 49, 60, 61, 72, 73, 84, 85, 102, 103, y modificaciones de secuencia  
 conservativas de las mismas. El anticuerpo puede incluir además una región variable de cadena ligera que incluye  
 una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 12, 13, 18, 19, 30, 31, 42, 43,

54, 55, 66, 67, 78, 79, 90, 91, 96, 97, 108, 109, y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas.

Una realización todavía adicional, anticuerpos aislados de la invención se unen a CD27 humana e incluyen una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que incluye las secuencias de aminoácidos; SEQ ID NOs: 37 y/o 43, respectivamente.

También se describe en el presente documento un anticuerpo aislado que se une a CD27 humana e incluyen una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que incluyen las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- (a) SEQ ID NOs: 49 y/o 55, respectivamente, y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas;
- (b) SEQ ID NOs: 103 y/o 109, respectivamente, y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas;
- (c) SEQ ID NOs: 85 y/o 91 y/o 97, respectivamente, y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas;
- (d) SEQ ID NOs: 25 y/o 31, respectivamente, y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas;
- (e) SEQ ID NOs: 73 y/o 79, respectivamente, y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas;
- (f) SEQ ID NOs: 7 y/o 13 y/o 19, respectivamente, y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas; y
- (g) SEQ ID NOs: 61 y/o 67, respectivamente, y modificaciones de secuencia conservativas de las mismas;

Anticuerpos aislados que incluyen regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen al menos el 90 %, o al menos el 95 %, o al menos el 96 %, o al menos el 97 %, o al menos el 98 %, o al menos el 99 %, o más identidad de secuencia con SEQ ID NOs: 37 y 43 o SEQ ID NOs: 35 y 41 también están incluidos en la presente invención. Intervalos intermedios a los valores anteriormente citados, por ejemplo, regiones variables de cadena pesada y ligera que tienen al menos el 90-95 % o el 95-100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NOs: 37 y 43 o SEQ ID NOs: 35 y 41 también pretenden estar englobados por la presente invención.

También se describen en el presente documento anticuerpos aislados que compiten para unirse a CD27 con los anticuerpos de la invención. También se describe en el presente documento un anticuerpo que compite para unirse a CD27 con un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 37 y 43, SEQ ID NOs: 49 y 55, SEQ ID NOs: 103 y 109, SEQ ID NOs: 85 y 91, SEQ ID NOs: 85 y 97, SEQ ID NOs: 25 y 31, SEQ ID NOs: 73 y 79, SEQ ID NOs: 7 y 13, SEQ ID NOs: 7 y 19, SEQ ID NOs: 61 y 67, respectivamente, o secuencias de aminoácidos al menos el 80 % idénticas a las mismas. En otro caso, el anticuerpo compite para unirse a CD27 con un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 37 y 43 (1F5), SEQ ID NOs: 49 y 55 (1H8) o SEQ ID NOs: 103 y 109 (3H12). En otro caso, el anticuerpo compite para unirse a CD27 con un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 25 y 31 (2C2), SEQ ID NOs: 7 y 13 (3H8), SEQ ID NOs: 7 y 19 (3H8), SEQ ID NOs: 61 y 67 (1G5) o SEQ ID NOs: 73 y 79 (2 g9). En otro caso más, el anticuerpo compite para unirse a CD27 con un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 85 y 91 (3A10) o SEQ ID NOs: 85 y 97 (3A10).

Otros anticuerpos descritos en el presente documento se unen a un epítipo sobre CD27 reconocido por los anticuerpos descritos en el presente documento. En otro caso particular, el anticuerpo se une a un epítipo sobre CD27 reconocido por un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 37 y 43, SEQ ID NOs: 49 y 55, SEQ ID NOs: 103 y 109, SEQ ID NOs: 85 y 91, SEQ ID NOs: 85 y 97, SEQ ID NOs: 25 y 31, SEQ ID NOs: 73 y 79, SEQ ID NOs: 7 y 13, SEQ ID NOs: 7 y 19, SEQ ID NOs: 61 y 67, respectivamente, o secuencias de aminoácidos al menos el 80 % idénticas a las mismas. En otro caso, el anticuerpo se une a un epítipo sobre CD27 reconocido por un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 37 y 43 (1F5), SEQ ID NOs: 49 y 55 (1H8) o SEQ ID NOs: 103 y 109 (3H12). En otro caso, el anticuerpo se une a un epítipo sobre CD27 reconocido por un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 25 y 31 (2C2), SEQ ID NOs: 7 y 13 (3H8), SEQ ID NOs: 7 y 19 (3H8), SEQ ID NOs: 61 y 67 (1G5) o SEQ ID NOs: 73 y 79 (2 g9). En otro caso más, el anticuerpo se une a un epítipo sobre CD27 reconocido por un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 85 y 91 (3A10) o SEQ ID NOs: 85 y 97 (3A10).

Los anticuerpos de la invención pueden ser de longitud completa, por ejemplo, cualquiera de los siguientes isotipos: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD e IgE. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser fragmentos tales como una porción de unión al antígeno o un anticuerpo monocatenario (por ejemplo, un Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, un fragmento Fv de cadena única, una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o una combinación de dos o más CDR aisladas). Los anticuerpos pueden ser cualquier tipo de anticuerpo, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos humanos, humanizados y quiméricos.

Los antígenos de tumor empleados por la presente invención (por ejemplo, en una vacuna, usada en combinación con un anticuerpo anti-CD27 de la invención) incluyen cualquier antígeno o determinante antigénico que está

presente en (o asociado a) una célula tumoral y no normalmente en células normales, o un antígeno o determinante antigénico que está presente en o asociado a células tumorales en cantidades mayores que en las células normales (no tumorales), o un antígeno o determinante antigénico que está presente en células tumorales en una forma diferente que la que se encuentra en células normales (no tumorales). Tales antígenos incluyen antígenos  
 5 específicos de tumor, que incluyen antígenos de membrana específicos de tumor, antígenos asociados a tumor, que incluyen antígenos de membrana asociados a tumor, antígenos embrionarios en tumores, receptores del factor de crecimiento, ligandos del factor de crecimiento, y cualquier otro tipo de antígeno que esté asociado al cáncer. Un antígeno de tumor puede ser, por ejemplo, un antígeno de cáncer epitelial (por ejemplo, mama, gastrointestinal, pulmón), un antígeno prostático específico (PSA) de cáncer o antígeno prostático específico de membrana (PSMA),  
 10 un antígeno de cáncer de vejiga, un antígeno de cáncer de pulmón (por ejemplo, pulmón de células pequeñas), un antígeno de cáncer de colon, un antígeno de cáncer de ovario, un antígeno de cáncer de cerebro, un antígeno de cáncer gástrico, un antígeno de carcinoma de celulares renales, un antígeno de cáncer pancreático, un antígeno de cáncer de hígado, un antígeno de cáncer esofágico, un antígeno de cáncer de cabeza y cuello o un antígeno de cáncer colorrectal. Por ejemplo, el antígeno puede incluir un antígeno de tumor, tal como  $\beta$ hCG, gp100 o Pmel17,  
 15 CEA, gp100, TRP-2, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), idiotipo, tirosinasa, telomerasa, SSX2, MUC-1, MAGE-A3 y antígeno de alto peso molecular asociado al melanoma (HMW-MAA) MART1, melan-A, EGFRvIII, NY-ESO-1, MAGE-1, MAGE-3, WT1, Her2 o mesotelina. Otros antígenos empleados por la presente invención (por ejemplo, en una vacuna, usada en combinación con un anticuerpo anti-CD27 de la invención) incluyen antígenos de patógenos de enfermedad infecciosa tales como virus, bacterias, parásitos y hongos, ejemplos de los cuales se desvelan en el  
 20 presente documento.

La invención también proporciona una molécula biespecífica que comprende el anticuerpo de la invención unido a una segunda molécula que tiene especificidad de unión que diferente de la del anticuerpo, en la que opcionalmente la segunda molécula se une a un receptor Fc, un receptor NK o un receptor de linfocitos T seleccionado de CD3,  
 25 CD40 y CD25. Por ejemplo, en una realización, la segunda molécula puede unirse a CD3 o CD40.

También se proporcionan composiciones que incluyen un anticuerpo o una molécula biespecífica de la invención, formulada con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En particular, la presente invención proporciona una composición que comprende el anticuerpo de la invención o la molécula biespecífica de la invención y un vehículo.  
 30 Las composiciones pueden incluir además un adyuvante, agente inmunoestimulante (por ejemplo, ligando CD40, ligando FLT 3, citocinas, factores estimulantes de colonias, un anticuerpo anti-CTLA-4, anticuerpo anti-PD1, anticuerpo anti-41BB, anticuerpo anti-OX-40, LPS (endotoxina), ARNms, ARNbc, Bacille Calmette-Guerin (BCG), clorhidrato de levamisol, inmunoglobulinas intravenosas y agonista del receptor tipo Toll (TLR) (por ejemplo, agonista de TLR3 tal como Poly IC, un agonista de TLR4, un agonista de TLR5, un agonista de TLR7, un agonista de TLR8 y un agonista de TLR9)), agente inmunosupresor, otro anticuerpo o un antígeno. Antígenos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un componente de un patógeno, un antígeno de tumor (por ejemplo,  $\beta$ hCG, gp100 o Pmel17, HER2/neu, WT1, mesotelina, CEA, gp100, MART1, TRP-2, melan-A, NY-ESO-1, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), idiotipo, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3, tirosinasa, telomerasa, antígenos SSX2, antígenos MUC-1 y antígenos de tumor derivados de células germinales), un antígeno de enfermedad infecciosa (por ejemplo, antígenos virales, antígenos bacterianos y parasíticos), un alérgeno, o un autoantígeno. Cualquiera de los antígenos desvelados en el presente documento puede incluirse en una composición de la invención.  
 40

Moléculas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención también están englobadas por la invención, además de vectores de expresión que comprenden tales ácidos nucleicos y células huésped que comprenden tales vectores de expresión. En particular, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo de la invención y una célula transformada con el vector de expresión de la invención. Por ejemplo, Se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal aislado que se une a CD27 humana, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera codificadas por secuencias de ácidos nucleicos seleccionadas del grupo que consiste en: (a) SEQ ID NOs: 5 y 11, respectivamente;  
 50 (b) SEQ ID NOs: 5 y 17, respectivamente; (c) SEQ ID NOs: 23 y 29, respectivamente; (d) SEQ ID NOs: 35 y 41, respectivamente; (e) SEQ ID NOs: 47 y 53, respectivamente; (f) SEQ ID NOs: 59 y 65, respectivamente; (g) SEQ ID NOs: 71 y 77, respectivamente; (h) SEQ ID NOs: 83 y 89, (i) SEQ ID NOs: 83 y 95; (j) SEQ ID NOs: 101 y 107, respectivamente, o secuencias de ácidos nucleicos que tienen al menos el 90 % de identidad con las secuencias de ácidos nucleicos de (a)-(h).  
 55

También se describen en el presente documento métodos de inducción o mejoramiento de una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria de linfocitos T, y/o una respuesta mediada por NK y/o una respuesta inmunitaria mediada por linfocitos B) contra un antígeno en un sujeto administrando al sujeto una cantidad eficaz de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo de longitud completa), composición o molécula biespecífica descrita en el presente documento. Tales métodos son particularmente adecuados para uso en terapias de vacuna.  
 60

Los anticuerpos y otras composiciones de la presente invención también pueden usarse para inhibir el crecimiento de células que expresan CD27 poniendo en contacto las células con un anticuerpo o una composición en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento de células que expresan CD27 (por ejemplo, en el tratamiento de cánceres). Anticuerpos útiles para inhibir el crecimiento de células que expresan CD27 incluyen anticuerpos de  
 65

longitud completa y fragmentos de los mismos, además de anticuerpos que contienen una segunda especificidad de unión por un receptor Fc. En un caso, las células que expresan CD27 se ponen en contacto con un anticuerpo en presencia de células efectoras en condiciones suficientes para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de células diana (por ejemplo, el anticuerpo induce al menos aproximadamente el 40 % de lisis específica de células que expresan CD27 a una concentración de 10 µg/ml y comprende las SEQ ID NOs: 61, 67, 85, 91, 97, 37 y/o 43). En otro caso, las células se ponen en contacto con un anticuerpo en condiciones suficientes para inducir la citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) de las células (por ejemplo, el anticuerpo induce al menos aproximadamente el 40 % de citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) de células que expresan CD27 a una concentración de 10 µg/ml y comprende las SEQ ID NOs: 7, 13, 19, 49, 55, 103 y/o 109).

En otro caso, el anticuerpo empleado para inhibir el crecimiento de células que expresan CD27 también puede poseer (o carecer de) características funcionales adicionales. Por ejemplo, el anticuerpo también puede inhibir la unión de CD70 a CD27 en células que expresan estas proteínas (por ejemplo, un mAb que comprende secuencias de regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden las SEQ ID NOs: 37 y/o 43 (mAb 1F5), SEQ ID NOs: 49 y/o 55 (mAb 1H8) o SEQ ID NOs: 103 y/o 109 (mAb 3H12). Alternativamente, el anticuerpo puede no inhibir la unión de CD70 a CD27 en tales células (por ejemplo, un mAb que comprende secuencias de regiones variables de cadena pesada y/o ligera que comprende las SEQ ID NOs: 61 y/o 67 (mAb 1G5), SEQ ID NOs: 85 y/o 91, 85 y/o 97 (mAb 3A10) o SEQ ID NOs: 7 y/o 13, 7 y/o 19 (mAb 3H8).

Las células que expresan CD27 incluyen todas y cada una de las células que expresan CD27, que incluyen, pero no se limitan a, linfocitos NK, linfocitos B y linfocitos T. En un caso particular, las células que expresan CD27 incluyen líneas celulares tales como células Jurkat, células Raji, células Ramos y células Daudi. En otro caso, las células que expresan CD27 son células tumorales o células cancerosas. En otro caso, las células que expresan CD27 incluyen linfocitos B, linfocitos NK, linfocitos T que se encuentran infiltrando tumores o células cancerosas, también denominados linfocitos infiltrantes de tumores.

Los métodos de inhibición del crecimiento de células que expresan CD27 que se describen en el presente documento pueden usarse para tratar y prevenir una amplia variedad de enfermedades y trastornos. Por ejemplo, los métodos pueden usarse para tratar o prevenir un cáncer (por ejemplo, un cáncer seleccionado del grupo que consiste en leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, eritroleucemia monocítica mielomonocítica promielocítica de mieloblastos, leucemia crónica, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células del manto, linfoma del sistema nervioso central primario, linfoma de Burkitt, linfoma de linfocitos B de la zona marginal, linfoma policitemia vera, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de las cadenas pesadas, tumores sólidos, sarcomas y carcinomas, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de colon, carcinoma colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón no de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma esofágico, carcinoma de células basales, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro y sistema nervioso central (SNC), cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cánceres colorrectales, cáncer de tejido conjuntivo, cáncer del aparato digestivo, cáncer endometrial, cáncer de esófago, cáncer de ojo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, neoplasia intraepitelial, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (de células pequeñas, de células grandes), melanoma, neuroblastoma; cáncer de cavidad bucal (por ejemplo, labios, lengua, boca y faringe), cáncer de ovarios, cáncer pancreático, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer rectal; cáncer del aparato respiratorio, sarcoma, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer uterino y cáncer del aparato urinario). Los cánceres preferidos incluyen tumores que expresan CD27 seleccionados del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica, linfoma de células del manto, linfoma del sistema nervioso central primario, linfoma de Burkitt y linfoma de linfocitos B de la zona marginal. En otro caso, los métodos pueden usarse para tratar o prevenir una infección bacteriana, fúngica, viral o parasítica.

También se describen en el presente documento métodos de inhibición de la unión de CD70 a CD27 en células en un sujeto que tiene un trastorno administrando al sujeto anticuerpos o composiciones como se describen en el presente documento, además de métodos de regulación por disminución de una respuesta de linfocitos T en un individuo que tiene un trastorno administrando a un sujeto anticuerpos o composiciones descritas en el presente documento. Estos métodos son, de manera ideal, aptos para uso en el tratamiento de trastornos inmunitarios, tales como rechazo del injerto, enfermedades autoinmunitarias y alergia. Anticuerpos útiles en estos métodos incluyen fragmentos Fab, además de una región Fc mutada de forma tal que el anticuerpo no se una, o tenga una unión significativamente reducida, a receptores Fc. En un caso particular, el anticuerpo comprende secuencias de regiones

variables de cadena pesada y/o ligera que comprenden SEQ ID NOs: 37 y/o 43 (mAb 1F5), SEQ ID NOs: 49 y/o 55 (mAb 1H8), o SEQ ID NOs: 103 y/o 109 (mAb 3H12).

5 Los métodos descritos en el presente documento para inhibir la unión de CD70 a CD27 en células y para regular por  
disminución una respuesta de linfocitos T pueden usarse para tratar una amplia variedad de enfermedades y  
trastornos, que incluyen, pero no se limitan a, rechazo del injerto, alergia y enfermedades autoinmunitarias. En un  
caso particular, la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis  
reumatoide, diabetes de tipo 1, psoriasis, enfermedad de Crohn y otras enfermedades inflamatorias del intestino  
tales como colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico (SLE), encefalomiелitis autoinmune, miastenia grave (MG),  
10 tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, pénfigo, enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmune,  
púrpura trombocitopénica autoinmune, esclerodermia con anticuerpos anti-colágeno, enfermedad mixta del tejido  
conjuntivo, polimiositis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison idiopática, infertilidad asociada autoinmune,  
glomerulonefritis, glomerulonefritis crascéntica, glomerulonefritis proliferativa, penfigoide bulloso, síndrome de  
Sjogren, artritis psoriásica, resistencia a la insulina, diabetes mellitus autoinmune, hepatitis autoinmune, hemofilia  
autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), hepatitis autoinmune, hemofilia autoinmune, síndrome  
15 linfoproliferativo autoinmune, uveorretinitis autoinmune, síndrome de Guillain-Barre, arteriosclerosis y enfermedad de  
Alzheimer).

20 La presente invención proporciona además usos particulares de los anticuerpos, composiciones y moléculas  
biespecíficas descritas en el presente documento. Por ejemplo, Se describe en el presente documento el uso de un  
anticuerpo, composición o molécula biespecífica en la fabricación de un medicamento para inducir o mejorar una  
respuesta inmunitaria contra un antígeno en un sujeto. También se describe en el presente documento un anticuerpo  
o composición en la fabricación de un medicamento para inhibir el crecimiento de células que expresan CD27, el uso  
de un anticuerpo o composición en la fabricación de un medicamento para inhibir la unión de CD70 a CD27 en  
25 células en un sujeto que tiene un trastorno, y el uso de un anticuerpo o composición en la fabricación de un  
medicamento para regular por disminución una respuesta de linfocitos T en un individuo que tiene un trastorno.  
También se describe en el presente documento un anticuerpo, composición o molécula biespecífica para su uso en  
inducir o mejorar una respuesta inmunitaria contra un antígeno en un sujeto, un anticuerpo o una composición para  
su uso en inhibir el crecimiento de células que expresan CD27, un anticuerpo o composición para su uso en inhibir la  
30 unión de CD70 a CD27 en células en un sujeto que tiene un trastorno, y un anticuerpo o composición para su uso en  
regular por disminución una respuesta de linfocitos T en un individuo que tiene un trastorno.

35 La presente invención también proporciona un método de detección de la presencia o ausencia de CD27 en una  
muestra biológica (1) poniendo en contacto una muestra biológica con un anticuerpo de la invención en la que el  
anticuerpo se marca con una sustancia detectable; y (2) detectando el anticuerpo unido a CD27, para así detectar la  
presencia o ausencia de CD27 en la muestra biológica.

40 También se describen en el presente documento kits que comprenden las composiciones (por ejemplo, anticuerpos  
y/o moléculas biespecíficas) de la invención y, opcionalmente, instrucciones para su uso. El kit puede contener  
además al menos un reactivo adicional, tal como una citocina o complemento, o uno o más anticuerpos adicionales  
de la invención.

45 Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción  
detallada y reivindicaciones.

#### Breve descripción de los dibujos

50 La **Figura 1** describe la afinidad y parámetros cinéticos para los mAb 1G5, 1H8, 3H12, 3H8, 2G9, 1F5, 3A10,  
2C2, ms 1A4, ms 9F4 y ms M-T271 como se ha determinado por el software Biacore™ BiaEvaluation (Biacore  
AB) con CD27 humana recombinante inmovilizada sobre el chip.

La **Figura 2** es un gráfico que muestra la unión de anticuerpos humanos anti-CD27 (2C2, 3H8, 1F5, 1G5, 1H8,  
2G9, 3A10 y 3H12) a CD27 humana purificada recombinante usando ELISA.

55 La **Figura 3** es un gráfico que muestra la unión mediante ELISA de 1F5 a CD27 humana o de mono (macaco)  
recombinante purificada.

60 La **Figura 4** es un gráfico que representa el efecto de anticuerpos humanos anti-CD27 (2C2, 3H8, 1F5, 1G5,  
1H8, 2G9, 3A10 y 3H12) y MslgG (1A4, 9F4 y M-T271) sobre la unión de CD70 soluble (sCD70) a proteína  
CD27 (mostrado como el % de bloqueo) mediante ELISA.

La **Figura 5** es un análisis de citometría de flujo de la unión de 1F5 a líneas celulares linfoblastoides humanas y  
el bloqueo de la unión de sCD70.

65 Las **Figuras 6A-D** son gráficos que muestran la unión de anticuerpos humanos anti-CD27 (2C2, 3H8 y 1F5) a  
CD27 en células Jurkat (Figura 4A), células Raji (Figura 4B), células Ramos (Figura 4C) y células Daudi (Figura

4D) como se evalúa por citometría de flujo.

La **Figura 7** es un gráfico que muestra la unión de anticuerpos humanos anti-CD27 (2C2, 3H8, 1F5, 1G5, 1H8, 2G9, 3A10 y 3H12) a CD27 en células Daudi se evalúa por citometría de flujo.

La **Figura 8** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un experimento de ELISA de bloqueo cruzado de anti-CD27, que demuestra que los anticuerpos 1F5, 1H8 y 3H12 son capaces de bloquearse de forma cruzada entre si y así se unen al mismo epítipo.

La **Figura 9** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un experimento de ELISA de bloqueo cruzado de anti-CD27, que demuestra que los anticuerpos 2C2, 3H8, 1G5 y 2G9 son capaces de bloquearse de forma cruzada entre sí y así se unen al mismo epítipo.

La **Figura 10** es un gráfico de barras que muestra los resultados de un experimento de ELISA de bloqueo cruzado de anti-CD27, que demuestra que la unión del anticuerpo 3A10 a CD27 no está completamente bloqueada de forma cruzada por cualquiera de los otros anticuerpos anti-CD27 probados, indicando así que 3A10 se une a un único epítipo, pero la unión de 3A10 está parcialmente bloqueada de forma cruzada por los anticuerpos 1F5, 1H8 y 3H12, que indica que el epítipo para 3A10 puede estar cerca del epítipo unido por los anticuerpos 1F5, 1H8 y 3H12.

La **Figura 11** es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDCC) usando los mAb 1F5, 2C2, 3H8, 1G5, 1H8, 2G9, 3A10 y 3H12.

La **Figura 12** es un gráfico que representa los resultados de otro ensayo de citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDCC) usando el mAb 1F5.

La **Figura 13** es un gráfico que representa los resultados de un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) usando los mAb 2C2, 1F5, 3H8, 1G5, 1H8, 2G9, 3A10, 3H12, Rituxan y HulG.

La **Figura 14** es un gráfico que describe los resultados de otro ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) usando el mAb 1F5.

La **Figura 15** es un alineamiento de las secuencias VH de anticuerpos humanos anti-CD27 (1F5 (SEQ ID NO: 36), 1G5 (SEQ ID NO: 60), 1H8 (SEQ ID NO: 48), 2C2 (SEQ ID NO: 24), 2G9 (SEQ ID NO: 72), 3A10 (SEQ ID NO: 84), 3H12 (SEQ ID NO: 102) y 3H8 (SEQ ID NO: 6)).

La **Figura 16** es un alineamiento de las secuencias VL de anticuerpos humanos anti-CD27 (1F5 (SEQ ID NO: 42), 1G5 (SEQ ID NO: 66), 1H8 (SEQ ID NO: 54), 2C2 (SEQ ID NO: 78), 2G9 (SEQ ID NO: 30), 3A10 (SEQ ID NO: 120), 3H12 (SEQ ID NO: 108) y 3H8 (SEQ ID NO: 12)).

Las **Figuras 17 y 18** muestran los resultados de un estudio de primates no humanos *in vivo* usando el mAb 1F5. En particular, la Figura 17 muestra 1F5 en linfocitos circulantes después de una dosis única. La Figura 18 muestra que 1F5 no agota significativamente los linfocitos circulantes.

La **Figura 19** representa los resultados de un ensayo de tinción de pentámeros en esplenocitos y glóbulos sanguíneos periféricos de ratón.

La **Figura 20** representa los resultados de un ensayo ELISPOT y el mejoramiento de la producción de IFN $\gamma$  usando anticuerpos anti-CD27.

La **Figura 21** muestra el mejoramiento por los mAb anti-CD27 de respuestas de linfocitos T a un antígeno de vacuna en un modelo de ratón transgénico por tinción de pentámeros y ELISPOT de IFN.

Las **Figuras 22A-C** son el protocolo para y resultados de un experimento que muestra que anti-CD27 mejora las respuestas de linfocitos T a una vacuna dirigida a APC ( $\alpha$ -DEC205-OVA). La Figura 22A muestra el protocolo para el experimento. La Figura 22B muestra los resultados de un experimento de tinción de tetrámeros para medir linfocitos T específicos de antígeno. La Figura 22C muestra los resultados de un ensayo ELISPOT IFN-gamma para medir linfocitos T específicos de antígeno.

Las **Figuras 23A-D** muestra los resultados de un experimento que muestra que anti-CD27 en combinación con el agonista del TLR3 PolyIC (a 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g o 100  $\mu$ g) mejora las respuestas de linfocitos T a una vacuna dirigida a APC ( $\alpha$ -DEC205-OVA). La Figura 23A es un gráfico que muestra el % de células positivas IFN-gamma entre linfocitos T CD8+ para tanto ratones no mutantes tratados con poly IC y el mAb 1F5 anti-CD27, ratones transgénicos para huCD27 tratados con poly IC y un anticuerpo IgG1 humano de control como ratones transgénicos huCD27 tratados con poly IC y el mAb 1F5 anti-CD27.

Las **Figuras 24 y 25** muestran resultados de un estudio de la administración del mAb anti-CD27 antes de la vacuna en presencia o ausencia de agonista T: LR y muestra la importancia del momento de administración del anticuerpo con relación a la vacuna.

5 Las **Figuras 26 y 27** muestran los resultados de la administración del mAb anti-CD27 en combinación con activación de TCR en linfocitos T de ratones transgénicos para CD27 humana, como se muestra por proliferación y producción de citocinas.

10 Las **Figuras 28A-D** son el protocolo para y los resultados de un experimento que muestra que anti-CD27 mejora la eficacia de una vacuna de  $\alpha$ -DEC205-OVA en un modelo de exposición a melanoma MO4 (B16-OVA). La Figura 24A muestra el protocolo para el experimento. La Figura 24B es un gráfico que representa el tamaño del tumor (en  $\text{mm}^2$ ) frente al número de días después de la inoculación del tumor en ratones sin tratar. La Figura 24C es un gráfico que representa el tamaño del tumor (en  $\text{mm}^2$ ) frente al número de días después de la inoculación del tumor en ratones tratados con la vacuna sola. La Figura 24D es un gráfico que representa el tamaño del tumor (en  $\text{mm}^2$ ) frente al número de días después de la inoculación del tumor en ratones tratados con la vacuna en combinación con un anticuerpo anti-CD27.

15 Las **Figuras 29A y B** son gráficos que demuestran la supervivencia prolongada de ratones transgénicos para CD27 humana (modelos de tumor) tras la exposición a un linfoma singénico y la administración de diversas dosis del mAb 1F5 anti-CD27.

20 Las **Figuras 30 a 32** muestran los resultados de un experimento que prueba el efecto del tratamiento con anti-CD27 en un modelo de xenoinjerto de Raji en ratones SCID.

25 La **Figura 30A** representa el tamaño del tumor (en  $\text{mm}^3$ ) frente al número de días tras la inoculación del tumor en ratones tanto sin tratar, tratados con un anticuerpo IgG1 humano de control como tratados con los anticuerpos 1F5 y 3H8 anti-CD27. Las flechas indican los días cuando se administró el tratamiento con anticuerpos por inyección i.p.

30 La **Figura 30B** muestra la supervivencia en un gráfico de Kaplan-Meier.

35 La **Figura 31A** representa el tamaño del tumor (en  $\text{mm}^3$ ) frente al número de días tras la inoculación del tumor en ratones tanto sin tratar, tratados con un anticuerpo IgG1 humano de control como tratados con el anticuerpo 1F5 anti-CD27. Las flechas indican los días cuando se administró el tratamiento con anticuerpos por inyección i.p. La **Figura 31B** muestra la supervivencia en un gráfico de Kaplan-Meier.

La **Figura 32** muestra los resultados de otro experimento que prueba el efecto del tratamiento con anti-CD27 en un modelo de xenoinjerto de Raji en ratones SCID en un gráfico de Kaplan-Meier.

40 La **Figura 33** muestra los resultados de un experimento que prueba el efecto del tratamiento con anti-CD27 en un modelo de xenoinjerto de Daudi en ratones SCID. La **Figura 33A** representa el tamaño del tumor (en  $\text{mm}^3$ ) frente al número de días tras la inoculación del tumor en ratones tanto tratados con un anticuerpo IgG1 humano de control como tratados con el anticuerpo 1F5 anti-CD27 (0,1 mg o 0,3 mg). Las flechas indican los días cuando se administró el tratamiento con anticuerpos por inyección i.p. La **Figura 33B** muestra la supervivencia en un gráfico de Kaplan-Meier.

45 La **Figura 34** muestra los resultados de un ensayo ELISPOT y que el mejoramiento de la producción de IFN $\gamma$  específica de antígeno usando anticuerpo anti-CD27 se anula cuando la porción Fc de la IgG es incapaz de acoplar receptores Fc.

50 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona anticuerpos anti-CD27 como se han definido anteriormente que presentan propiedades funcionales particulares que se correlacionan con beneficios terapéuticos significativos, que incluyen regulación por incremento de la función inmune (por ejemplo, respuestas inmunitarias de linfocitos T como en terapias de vacuna, activación de NK en terapias de cáncer), inhibición del crecimiento celular (por ejemplo, en terapia del cáncer) y regulación por disminución de respuestas inmunitarias de linfocitos T (por ejemplo, en terapia autoinmune). Estas características funcionales incluyen, por ejemplo: (1) inhibición de (por ejemplo, bloquea completa o parcialmente) la unión de CD70 soluble a células que expresan CD27 al menos aproximadamente el 70 %, además, por ejemplo, al menos el 80 % o al menos el 90 % (2) unión a CD27 humana con una  $K_D$  de  $1 \times 10^{-9}$  M o menos, (3) inducción de al menos aproximadamente el 40 % de citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) de células que expresan CD27 a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$ , (4) inducción de al menos aproximadamente el 40 % de lisis específica de células que expresan CD27 por ADCC a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  (además, por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 %, al menos aproximadamente el 60 % o al menos aproximadamente el 70 % de lisis específica) (5) inducción o mejoramiento de respuestas inmunitarias, especialmente respuestas TH1 y/o (6) inducción o mejoramiento de actividad de linfocitos T, especialmente números y/o actividad de linfocitos T

CD8+ específicos. Los anticuerpos incluyen regiones variables de cadena pesada y ligera particulares y/o secuencias de CDR como se ha definido anteriormente.

5 Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. A lo largo de la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

10 El término "CD27" (también denominado "molécula de CD27", "receptor de CD27L", "S1521", "antígeno CD27 de activación de linfocitos T", "TNFRSF7", "MGC20393", "miembro 7 de la superfamilia del receptor de necrosis tumoral", "antígeno S152 de activación de linfocitos T", "Tp55", "miembro 7 de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral", "antígeno CD27" y "antígeno CD27 de activación de linfocitos T") se refiere a un receptor que es un miembro de la superfamilia del receptor del TNF, que se une al ligando CD70. CD27 es requerido para la generación y el mantenimiento a largo plazo de la inmunidad de linfocitos T y desempeña una función clave en la regulación de la activación de linfocitos B y la síntesis de inmunoglobulinas. El término "CD27" incluye cualquier variante o isoforma de CD27 que sea naturalmente expresada por células (por ejemplo, CD27 humana depositada en GENBANK® que tiene el N.º de acceso AAH12160.1). Por consiguiente, los anticuerpos de la invención pueden reaccionar de forma cruzada con CD27 de especies distintas de la humana. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser específicos para la CD27 humana y pueden no presentar reactividad cruzada con otras especies. CD27 o cualquier variante o isoforma de la misma pueden tanto aislarse de células o tejidos que las expresan naturalmente como ser producidas recombinantemente usando técnicas muy conocidas en la técnica y/o aquellas descritas en el presente documento. Preferentemente, los anticuerpos se dirigen a hCD27 que tiene un patrón de glucosilación normal.

15 Genbank® (N.º de acceso AAH12160.1) informa la secuencia de aminoácidos de CD27 humana como sigue (SEQ ID NO:1):

25  
30  
1 marphpwwlc vgltlvgsa tpaokscper hywaqgklcc qmcepgtflv kcdqhrkaa  
61 qcdpcipgvs fspdhhtrph ceschrncsg llvrnctia naecacrngw qcrdkectec  
121 dplpnpsita rssqalsphp qpthlpvse mleartaghm qtladfrqlp artlsthwpp  
181 qrslcssdfi rilvifsgmf lvtlagalf lhqrrkyrsn kgespvepae pcryscpree  
241 egstipiqed yrkpepacsp

35 El término "CD70" (también denominado "molécula de CD70", "CD27L", "CD27LG", "TNFSF7", "miembro 7 de la superfamilia del factor (ligando) de necrosis tumoral", "ligando de CD27", "antígeno CD70" "antígeno de superficie CD70", "miembro 7 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral", "antígeno de Ki-24" y "CD27-L") se refiere al ligando para CD27 (véase, por ejemplo, Bowman MR et al., J. Immunol. 1994 Feb 15;152(4):1756-61). CD70 es una proteína transmembranaria tipo II que pertenece a la familia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNF). Es un antígeno de superficie en linfocitos T y B activados que induce la proliferación de linfocitos T co-estimulados, mejora la generación de linfocitos T citolíticos y contribuye a la activación de linfocitos T. También se ha sugerido que CD70 desempeña una función en regular la activación de linfocitos B, la función citotóxica de linfocitos citolíticos espontáneos y la síntesis de inmunoglobulinas (Hintzen RQ et al., J. Immunol. 1994 Feb 15;152(4):1762-73).

40 Genbank® (N.º de acceso NP\_001243) informa la secuencia de aminoácidos de CD70 humana como sigue (SEQ ID NO: 2):

45  
50  
1 mpeegsgcsv rrrpygcvlr aalvplvagi viclwciqr faqaqqqlpl eslgwdvae  
61 qlnhgtgqqd prlywqggpa lgrsflhpe ldkgqlrhr dgymvhiqv tlaicsssta  
121 srhhpttlav gicsparsl slrlsfhqg ctiasqrtp largdtlctn ltgtllpsrn  
181 tdetffgvqw vrp

55 El término "anticuerpo", como se hace referencia en el presente documento, incluye anticuerpos completos y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, "porción de unión al antígeno") o una cadena simple del mismo. Un "anticuerpo" se refiere, en una realización preferida, a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión al antígeno de la misma. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como V<sub>H</sub>) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como V<sub>L</sub>) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de cadena pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a los tejidos huésped o factores, que incluyen diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema del complemento clásico.

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, CD27 humana). Tales "fragmentos" tienen, por ejemplo, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 1500 aminoácidos de longitud, adecuadamente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 745 aminoácidos de longitud, adecuadamente aproximadamente 8 a aproximadamente 300, por ejemplo, aproximadamente 8 a aproximadamente 200 aminoácidos, o aproximadamente 10 a aproximadamente 50 o 100 aminoácidos de longitud. Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios  $V_L$ ,  $V_H$ , CL y CH1; (ii) un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios  $V_H$  y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios  $V_L$  y  $V_H$  de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio  $V_H$  y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden estar opcionalmente unidas por un conector sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv,  $V_L$  y  $V_H$ , están codificados por genes separados, pueden unirse usando métodos recombinantes mediante un conector sintético que les permite conformarse como una cadena de una única proteína en la que las regiones  $V_L$  y  $V_H$  se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426 y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos monocatenarios estén englobados dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se criban para utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos. Las porciones de unión al antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante o mediante escisión enzimática o química de inmunoglobulinas intactas.

Un "anticuerpo biespecífico" o "bifuncional" es un anticuerpo híbrido artificial que tiene dos pares de cadenas pesadas/ligeras diferentes y dos sitios de unión diferentes. Pueden producirse anticuerpos biespecíficos mediante una variedad de métodos, que incluyen la fusión de hibridomas o enlace de fragmentos Fab'. Véase, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148, 1547-1553 (1992).

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que presenta una especificidad y afinidad de unión única por un epítopo particular. Por consiguiente, el término "anticuerpo monoclonal humano" se refiere a un anticuerpo que presenta una especificidad de unión única y que tiene regiones variables y constantes opcionales derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se producen por un hibridoma que incluye un linfocito B obtenido de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados con una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de la inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir del mismo, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica corte y empalme de secuencias de genes de la inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes que comprenden regiones variables y constantes que utilizan secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana particulares están codificados por los genes de la línea germinal, pero incluyen reordenaciones y mutaciones posteriores que ocurren, por ejemplo, durante la maduración del anticuerpo. Como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Lonberg (2005) Nature Biotech. 23(9):1117-1125), la región variable contiene el dominio de unión al antígeno, que está codificado por diversos genes que se reordenan para formar un anticuerpo específico para un antígeno extraño. Además de la reordenación, la región variable puede modificarse adicionalmente por múltiples cambios de un único aminoácido (denominados mutación somática o hipermutación) para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno extraño. La región constante cambiará en respuesta adicional a un antígeno (es decir, cambio de isotipo). Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico reordenadas y somáticamente mutadas que codifican los polipéptidos de inmunoglobulina de cadena ligera y cadena pesada en respuesta a un antígeno pueden no tener identidad de secuencia con las moléculas de ácido nucleico originales, pero en su lugar serán sustancialmente idénticas o similares (es decir, tienen al menos el 80 % de identidad).

El término "anticuerpo humano" incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes (si están presentes) de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*) (véase, Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859); Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:4 9-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol 13: 65-93 y Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764:536-546). Sin embargo, el término "anticuerpo humano" no incluye

anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se injertaron sobre secuencias de la región estructural humana (es decir, anticuerpos humanizados).

5 Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con el organismo no humano transgénico que produce un anticuerpo tal. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente a la encontrada en un organismo que no consiste en el animal no humano transgénico y generalmente de una especie distinta a la del animal no humano transgénico.

10 Un "anticuerpo aislado", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CD27 humana está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de CD27 humana). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo de puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otras proteínas CD27 de especies diferentes. Sin embargo, el anticuerpo  
15 preferentemente siempre se une a CD27 humana. Además, un anticuerpo aislado está normalmente sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. En una realización de la invención, una combinación de anticuerpos "aislados" que tienen diferentes especificidades por CD27 se combina en una composición bien definida.

20 El término "epítipo" o "determinante antigénico" se refiere a un sitio sobre un antígeno al que se une específicamente una inmunoglobulina o un anticuerpo. Los epítopes pueden estar formados tanto de aminoácidos contiguos como de aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por plegamiento terciario de una proteína. Los epítopes formados de aminoácidos contiguos normalmente se retienen tras la exposición a disolventes desnaturizantes, mientras que los epítopes formados por plegamiento terciario normalmente se pierden tras el tratamiento con  
25 disolventes desnaturizantes. Un epítipo normalmente incluye al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos en una conformación espacial única. Son muy conocidos en la técnica métodos de determinación de qué epítopes se unen por un anticuerpo dado (es decir, mapeo de epítopes) e incluyen, por ejemplo, ensayos de inmunotransferencia e inmunoprecipitación, en los que la superposición de péptidos contiguos de CD27 se prueba para reactividad con el anticuerpo anti-CD27 dado. Métodos de determinación de la conformación espacial de epítopes incluyen técnicas en la materia y aquellas descritas en el presente documento, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear de 2 dimensiones (véase, por ejemplo, Epítipo Mapping Protocols in  
30 Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

También se describen en el presente documento anticuerpos que se unen a un epítipo sobre CD27 que comprende todo o una porción de un epítipo reconocido por los anticuerpos particulares descritos en el presente documento (por ejemplo, la misma región o una que se superpone o una región entre la región o que la comprende).  
35

También se describen en el presente documento anticuerpos que se unen el mismo epítipo y/o anticuerpos que compiten por unirse a CD27 humana con los anticuerpos descritos en el presente documento. Los anticuerpos que reconocen el mismo epítipo o compiten por unirse pueden identificarse usando técnicas rutinarias. Tales técnicas incluyen, por ejemplo, un inmunoensayo, que muestra la capacidad de un anticuerpo para bloquear la unión de otro anticuerpo a un antígeno diana, es decir, un ensayo de unión competitiva. La unión competitiva se determina en un ensayo en el que la inmunoglobulina a prueba inhibe la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común, tal como CD27. Se conocen numerosos tipos de ensayos de unión competitiva, por ejemplo:  
45 radioinmunoensayo directo o indirecto de fase sólida (RIA), inmunoensayo enzimático directo o indirecto de fase sólida (EIA), ensayo de competición sándwich (véase Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983)); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (véase Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)); ensayo de marcado directo de fase sólida, ensayo sándwich de marcado directo de fase sólida (véase Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA de marca directa de fase sólida usando marca de I-125 (véase Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7 (1988)); EIA de biotina-avidina directo de fase sólida (Cheung et al., Virology 176:546 (1990)) y RIA de marcado directo (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990)). Normalmente, un ensayo tal implica el uso de antígeno purificado unido a una superficie sólida o células que llevan cualquiera de estos, una inmunoglobulina de prueba no marcada y una inmunoglobulina de referencia marcada. La inhibición competitiva se mide determinando la cantidad de marca unida a la superficie sólida o las células en presencia de la inmunoglobulina de prueba. Normalmente, la inmunoglobulina de prueba está presente en exceso.  
55 Normalmente, cuando un anticuerpo que compite está presente en exceso, inhibirá la unión específica de un anticuerpo de referencia a un antígeno común al menos el 50-55 %, 55-60 %, 60-65 %, 65-70 % 70-75 % o más.

Otras técnicas incluyen, por ejemplo, métodos de mapeo de epítopes, tales como, análisis de rayos X de cristales de complejos de antígeno:anticuerpo que proporcionan resolución atómica del epítipo. Otros métodos monitorizan la unión del anticuerpo a fragmentos de antígeno o variaciones mutadas del antígeno donde la pérdida debido a una modificación de un resto de aminoácido dentro de la secuencia de antígeno se considera frecuentemente una indicación de un componente de epítipo. Además, también pueden usarse métodos combinatorios informáticos para el mapeo de epítopes. Estos métodos se basan en la capacidad del anticuerpo de interés para aislar por afinidad péptidos cortos específicos de bibliotecas de péptidos de presentación en fagos combinatorias. Los péptidos se consideran como ejemplos para la definición del epítipo correspondiente al anticuerpo usado para cribar la  
60  
65

biblioteca de péptidos. Para el mapeo de epítopes, también se han desarrollado algoritmos informáticos que se ha demostrado que mapean epítopes conformacionales discontinuos.

5 Como se usa en el presente documento, los términos "unión específica", "unión selectiva", "se une selectivamente" y "se une específicamente" se refieren a la unión de un anticuerpo a un epítope sobre un antígeno predeterminado. Normalmente, el anticuerpo se une con una constante de disociación en equilibrio ( $K_D$ ) de aproximadamente menos de  $10^{-7}$  M, tal como aproximadamente menos de  $10^{-8}$  M,  $10^{-9}$  M o  $10^{-10}$  M o incluso menos cuando se determina por tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIACORE 2000 usando CD27 humana recombinante como analito y el anticuerpo como ligando y se une al antígeno predeterminado con una  
10 afinidad que es al menos dos veces superior a su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto al antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado. Las expresiones "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se usan indistintamente en el presente documento con el término "un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno".

15 El término " $K_D$ ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Normalmente, los anticuerpos humanos de la invención se unen a CD27 con una constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) de aproximadamente  $10^{-8}$  M o menos, tal como menos de  $10^{-9}$  M o  $10^{-10}$  M o incluso menor cuando se determina por tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) en un instrumento BIACORE 2000 usando CD27 humana recombinante como analito y el anticuerpo como ligando.  
20

El término " $k_d$ ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo de anticuerpo/antígeno.

25 El término " $k_a$ ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de asociación para la asociación de un anticuerpo con el antígeno.

30 El término "CE50", como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración de un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo, que induce una respuesta, ya sea en un ensayo *in vitro* o *in vivo*, que es el 50 % de la respuesta máxima, es decir, intermedia entre la respuesta máxima y el punto de referencia.

35 Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que se codifica por genes de la región constante de cadena pesada. En una realización, un anticuerpo monoclonal humano de la invención es del isotipo IgG1. En otra realización, un anticuerpo monoclonal humano de la invención es del isotipo IgG2.

El término "se une a CD27 inmovilizada" se refiere a la capacidad de un anticuerpo humano de la invención para unirse a CD27, por ejemplo, expresada en la superficie de una célula o que está unida a un soporte sólido.

40 El término "reacciona de forma cruzada", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un anticuerpo de la invención para unirse a CD27 de una especie diferente. Por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención que se une a CD27 humana también puede unirse a otra especie de CD27. Como se usa en el presente documento, la reactividad cruzada se mide detectando una reactividad específica con un antígeno purificado en ensayos de unión (por ejemplo, SPR, ELISA) o unión a, o interaccionando funcionalmente de otro modo con, células que fisiológicamente expresan CD27. Métodos de determinación de la reactividad cruzada incluyen ensayos de  
45 unión estándar tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, por análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) Biacore™ usando un instrumento Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Suecia) o técnicas de citometría de flujo.

50 Como se usa en el presente documento, "cambio de isotipo" se refiere al fenómeno mediante el cual la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.

55 Como se usa en el presente documento, "isotipo no cambiado" se refiere a la clase isotípica de cadena pesada que se produce cuando no ha tenido lugar cambio de isotipo; el gen CH que codifica el isotipo no cambiado es normalmente el primer gen CH inmediatamente en la dirección 3' del gen VDJ funcionalmente reordenado. El cambio de isotipo se ha clasificado como cambio de isotipo clásico y no clásico. El cambio de isotipo clásico se produce mediante eventos de recombinación que implican al menos una región de secuencia de cambio en el transgén. El cambio de isotipo no clásico puede producirse mediante, por ejemplo, recombinación homóloga entre  $\sigma_\mu$  humano y  $\Sigma_\mu$  humano (deleción asociada a  $\delta$ ). Pueden producirse mecanismos de cambio no clásicos  
60 alternativos, tales como la recombinación intertransgénica y/o intercromosómica, entre otros, y producir el cambio de isotipo.

65 Como se usa en el presente documento, el término "secuencia de cambio" se refiere a aquellas secuencias de ADN responsables de la recombinación de cambio. Una secuencia "donante de cambio", típicamente una región de cambio  $\mu$ , se encontrará 5' (es decir, aguas arriba) de la región de construcción que va a delecionarse durante la recombinación de cambio. La región "aceptora de cambio" estará entre la región de construcción que va a

delecionarse y la región constante de sustitución (por ejemplo,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , etc.). Debido a que no hay un sitio específico donde siempre se produce la recombinación, la secuencia génica final no será normalmente predecible a partir de la construcción.

5 Como se usa en el presente documento, "patrón de glucosilación" se define como el patrón de unidades de hidratos de carbono que están covalentemente unidas a una proteína, más específicamente a una proteína inmunoglobulina. Un patrón de glucosilación de un anticuerpo heterólogo puede caracterizarse por ser sustancialmente similar a patrones de glucosilación que producen naturalmente en anticuerpos producidos por las especies del animal transgénico no humano, cuando un experto en la técnica reconocería que el patrón de glucosilación del anticuerpo heterólogo se parece más a dicho patrón de glucosilación en la especie del animal transgénico no humano que en la especie de la que derivan los genes CH del transgén.

15 El término "que existe de forma natural", como se usa en el presente documento como se aplica a un objeto, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, existe de forma natural una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo (que incluyen los virus) que puede aislarse de una fuente de la naturaleza y que no ha sido intencionalmente modificada por el ser humano en el laboratorio.

20 El término "reordenado", como se usa en el presente documento, se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o de cadena ligera en el que un segmento V se posiciona inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio  $V_H$  o  $V_L$  completo, respectivamente. Un locus del gen de inmunoglobulina reordenado puede identificarse por comparación con ADN de la línea germinal; un locus reordenado tendrá al menos un elemento de homología heptámero/nonámero recombinado.

25 El término "no reordenado" o "configuración de la línea germinal", como se usa en el presente documento en referencia a un segmento V, se refiere a la configuración en la que el segmento V no recombina de manera que sea inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

30 El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

35 El término "molécula de ácido nucleico aislada", como se usa en el presente documento en referencia a ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpos (por ejemplo,  $V_H$ ,  $V_L$ , CDR3) que se unen a CD27, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico en la que las secuencias de nucleótidos que codifican el anticuerpo o porción de anticuerpo están libres de otras secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos o porciones de anticuerpos que se unen a antígenos que no son CD27, que otras secuencias pueden flanquear naturalmente el ácido nucleico en el ADN genómico humano. Por ejemplo, SEQ ID NOs: 35 y 41, 47 y 53, 101 y 107, 83 y 89, 83 y 95, 23 y 29, 71 y 77 se corresponden, respectivamente, con las secuencias de nucleótidos que comprenden las regiones variables de cadena pesada ( $V_H$ ) y cadena ligera ( $V_L$ ) de anticuerpos monoclonales del anticuerpo anti-CD27 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8 y 1G5.

45 También se describen en el presente documento "modificaciones de secuencia conservativas" de las secuencias expuestas en SEQ ID NOs: 5-112, es decir, las modificaciones de secuencias de nucleótidos y aminoácidos que no anulan la unión del anticuerpo codificado por la secuencia de nucleótidos o que contienen la secuencia de aminoácidos, al antígeno. Tales modificaciones de secuencia conservativas incluyen sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos, además de adiciones y delecciones de nucleótidos y aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones pueden introducirse en las SEQ ID NOs: 5-112 por técnicas convencionales conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que el resto de aminoácido se sustituye con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales 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, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Así, un resto de aminoácido no esencial predicho en un anticuerpo anti-CD27 humano se sustituye preferentemente con otro resto de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Los métodos de identificación de sustituciones conservativas de nucleótidos y aminoácidos que no eliminan la unión al antígeno son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Brummell et al., *Biochem.* 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); y Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

65 Alternativamente, en otra realización, pueden introducirse mutaciones de manera aleatoria a lo largo de toda o una parte de una secuencia codificante del anticuerpo anti-CD27, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-CD27 modificados resultantes pueden cribarse para la actividad de unión.

Para los ácidos nucleicos, el término "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y comparan de manera óptima, son idénticas, con o deleciones de nucleótidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 80 % de los nucleótidos, normalmente al menos aproximadamente el 90 % al 95 %, y más preferentemente al menos aproximadamente el 98 % al 99,5 % de los nucleótidos. Alternativamente, existe homología sustancial cuando los segmentos se hibridan en condiciones de hibridación selectivas, con el complemento de la hebra.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, (es decir, el % de homología =  $N.^{\circ}$  de posiciones idénticas/ $N.^{\circ}$  total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias pueden llevarse a cabo usando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes más adelante.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso por hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos puede también determinarse usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuo de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>), usando tanto una matriz Blossum 62 como una matriz PAM250, y un peso por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una longitud por hueco de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

Las secuencias de ácido nucleico y de proteína de la presente invención pueden usarse adicionalmente como una "secuencia de búsqueda" para realizar una búsqueda por comparación con bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación= 100, longitud de palabra= 12, para obtener secuencias de nucleótidos homologas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación= 50, longitud de palabra= 3, para obtener secuencias de aminoácidos homologas a las moléculas de proteínas de la invención. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Si se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado de células o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares u otros contaminantes, por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares, mediante técnicas convencionales, que incluyen tratamiento alcalino/SDS, bandeado con CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros muy conocidos en la técnica. Véase, F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987).

Las composiciones de ácido nucleico de la presente invención, aunque frecuentemente están en una secuencia nativa (excepto por sitios de restricción modificados y similares), de tanto ADNc, genómico, como mezclas de los mismos, pueden mutarse, según técnicas convencionales para proporcionar secuencias génicas. Para secuencias codificantes, estas mutaciones pueden afectar la secuencia de aminoácidos según se desee. En particular, se contemplan secuencias de ADN sustancialmente homólogas a o derivadas de V, D, J nativos, constantes, cambios y otras secuencias tales descritas en el presente documento (donde "derivadas" indica que una secuencia es idéntica o se modificó a partir de otra secuencia).

Un ácido nucleico está "operativamente unido" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un promotor o mejorador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia. Con respecto a las secuencias reguladoras de la transcripción, operativamente unidas significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas y, donde sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en marco de lectura. Para secuencias de cambio, operativamente unidas indica que las secuencias son capaces de efectuar recombinación de cambio.

El término "vector", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular dentro del cual puede unirse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que puede unirse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos son capaces de replicarse de manera autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, los vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por

ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y así se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están operativamente unidos. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más comúnmente usada. Sin embargo, la invención pretende incluir tales otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados) que cumplen funciones equivalentes.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no solo a la célula objeto particular, sino a la progenie de una célula tal. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido a tanto mutación como a influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero igualmente estar incluida dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se refiere a cualquier sustancia inmunogénica natural o sintética, tal como una proteína, péptido o hapteno. Antígenos adecuados para su uso en la presente invención (por ejemplo, en una vacuna en combinación con un anticuerpo anti-CD27 de la invención) incluyen, por ejemplo, antígenos de enfermedades infecciosas y antígenos de tumor, contra los que se desean respuestas inmunitarias protectoras o terapéuticas, por ejemplo, antígenos expresados por una célula tumoral o un organismo patógeno o antígenos de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, antígenos adecuados incluyen antígenos asociados a tumor para la prevención o el tratamiento de cánceres. Ejemplos de antígenos asociados a tumor incluyen, pero no se limitan a, secuencias que comprenden toda o parte de las secuencias de  $\beta$ hCG, gp100 o Pmel17, HER2/neu, WT1, mesotelina, CEA, gp100, MART1, TRP-2, melan-A, NY-ESO-1, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), idiotipo, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3, tirosinasa, telomerasa, antígenos SSX2 y MUC-1, y antígenos de tumor derivados de células germinativas. Antígenos asociados a tumor también incluyen los antígenos de los grupos sanguíneos, por ejemplo, los antígenos Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup>, LeX, LeY, H-2, B-1, B-2. Alternativamente, puede incluirse más de un antígeno dentro de las construcciones de antígeno-anticuerpo de la invención. Por ejemplo, puede combinarse un antígeno MAGE con otros antígenos tales como melanina A, tirosinasa y gp100 junto con adyuvantes tales como GM-CSF o IL-12, y unirse a un anticuerpo anti-APC.

Otros antígenos adecuados incluyen antígenos virales para la prevención o el tratamiento de enfermedades virales. Ejemplos de antígenos virales incluyen, pero no se limitan a, antígenos gag de VIH-1, env de VIH-1, nef de VIH-1, VHB (antígenos superficiales o de núcleo), VPH, FAS, VHS-1, VHS-2, p17, ORF2 y ORF3. Ejemplos de antígenos bacterianos incluyen, pero no se limitan a, *Toxoplasma gondii* o *Treponema pallidum*. Los conjugados de anticuerpo-antígeno bacteriano de la invención pueden ser en el tratamiento o la prevención de diversas enfermedades bacterianas tales como carbunco, botulismo, tétanos, clamidia, cólera, difteria, enfermedad de Lyme, sífilis y tuberculosis. Otros antígenos adecuados de patógenos de enfermedades infecciosas, tales como virus, bacterias, parásitos y hongos, se desvelan más adelante.

Secuencias de los antígenos anteriores son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, se proporciona un ejemplo de una secuencia de ADNc de MAGE-3 en el documento US 6.235.525 (Ludwig Institute for Cancer Research); se proporcionan ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas de NY-ESO-1 en los documentos US 5.804.381 y US 6.069.233 (Ludwig Institute for Cancer Research); se proporcionan ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas de Melan-A en los documentos US 5.620.886 y US 5.854.203 (Ludwig Institute for Cancer Research); se proporcionan ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas de NY-BR-1 en los documentos US 6.774.226 y US 6.911.529 (Ludwig Institute for Cancer Research) y se proporcionan ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos y de proteínas de NY-CO-58 en el documento WO 02090986 (Ludwig Institute for Cancer Research); un ejemplo de una secuencia de aminoácidos para la proteína HER-2/neu está disponible en el N.º de acceso de GENBANK® AAA58637; y una secuencia de nucleótidos (ARNm) para 1 similar a antígeno carcinoembrionario (CEA-1) está disponible en el N.º de acceso de GENBANK® NM 020219.

Un antígeno de VPH que puede usarse en las composiciones y los usos de la invención puede incluir, por ejemplo, un antígeno de VPH-16, un antígeno de VPH-18, un antígeno de VPH-31, un antígeno de VPH-33 y/o un antígeno de VPH-35; y es adecuadamente un antígeno VPH-16 y/o un antígeno VPH-18. Se describe un genoma de VPH-16 en *Virology*, 145:181- 185 (1985) y secuencias de ADN que codifican VPH-18 se describen en la patente de EE.UU. N.º 5.840.306. Los antígenos de VPH-16 (por ejemplo, las regiones serorreactivas de las proteínas E1 y/o E2 de VPH-16) se describen en la patente de EE.UU. N.º 6.531.127, y los antígenos de VPH-18 (por ejemplo, las regiones serorreactivas de las proteínas L1 y/o L2 de VPH-18) se describen en la patente de EE.UU. N.º 5.840.306. Similarmente, está disponible un genoma completo para VHB en el N.º de acceso de GENBANK® NC\_003977. El genoma del VHC se describe en la solicitud de patente europea N.º 318 216. El documento PCT/US90/01348 desvela información de preparaciones de clones del genoma del VHC, secuencias de aminoácidos de proteínas virales del VHC y métodos de secuenciación y uso de tales composiciones para vacunas del VHC que comprenden proteínas del VHC y péptidos derivados de ellas.

Pueden identificarse péptidos antigénicos de proteínas (es decir, aquellos que contienen epítopes de linfocitos T) de una variedad de maneras muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, los epítopes de linfocitos T pueden predecirse analizando la secuencia de la proteína usando algoritmos predictivos basado en la web (BIMAS y SYFPEITHI) para generar posibles péptidos de unión a MHC clase I y II que coinciden con una base de datos interna de 10.000 péptidos de unión a MHC bien caracterizados definidos previamente por CTL. Pueden clasificarse y seleccionarse péptidos de alta puntuación como "interesantes" basándose en la alta afinidad con una molécula de MHC dada.

Otro método de identificación de péptidos antigénicos que contienen epítopes de linfocitos T es dividiendo la proteína en péptidos no superpuestos de longitud deseada o péptidos superpuestos de longitudes deseadas que pueden producirse recombinantemente, sintéticamente, o en ciertas situaciones limitadas, mediante escisión química de la proteína y probarse para propiedades inmunogénicas, por ejemplo, provocando una respuesta de linfocitos T (es decir, proliferación o secreción de linfocinas).

Con el fin de determinar epítopes de linfocitos T precisos de la proteína mediante, por ejemplo, técnicas de mapeo fino, un péptido que tiene actividad estimuladora de linfocitos T y así que comprende al menos un epítope de linfocitos T, como se ha determinado por técnicas de biología de linfocitos T, puede modificarse mediante la adición o deleción de restos de aminoácidos en tanto el extremo amino como carboxi del péptido y probarse para determinar un cambio en la reactividad de linfocitos T con el péptido modificado. Si se encuentra que dos o más péptidos que comparten un área de superposición en la secuencia de proteína nativa tienen actividad estimuladora de linfocitos T humanos, como se ha determinado por técnicas de biología de linfocitos T, pueden producirse péptidos adicionales que comprenden toda o una porción de tales péptidos y estos péptidos adicionales pueden probarse mediante un procedimiento similar. Siguiendo esta técnica, los péptidos se seleccionan y producen recombinantemente o sintéticamente. Los péptidos se seleccionan basándose en diversos factores, que incluyen la intensidad de la respuesta de linfocitos T al péptido (por ejemplo, índice de estimulación). Las propiedades físicas y químicas de estos péptidos seleccionados (por ejemplo, solubilidad, estabilidad) pueden entonces examinarse para determinar si los péptidos son adecuados para su uso en composiciones terapéuticas o si los péptidos requieren modificación.

El término "célula presentadora de antígenos" o "APC" es una célula que presenta un antígeno extraño complejo con MHC en su superficie. Los linfocitos T reconocen este complejo utilizando un receptor de linfocitos T (TCR). Ejemplos de APC incluyen, pero no se limitan a, células dendríticas (DC), células mononucleares de sangre periférica (CMSP), monocitos (tales como THP-1), células linfoblastoides B (tales como C1R.A2, 1518 B-LCL) y células dendríticas derivadas de monocitos (DC). Algunas APC internalizan antígenos tanto por fagocitosis como por endocitosis mediada por receptor. Ejemplos de receptores de APC incluyen, pero no se limitan a, lectinas tipo C, tales como el receptor humano 205 de células dendríticas y epiteliales (CD27) y el receptor humano de manosa de macrófago.

El término "presentación de antígenos" se refiere al proceso por el que las APC capturan antígenos y permite su reconocimiento por linfocitos T, por ejemplo, como un componente de un conjugado de MHC-I y/o MHC-II.

Las "moléculas MHC" incluyen dos tipos de moléculas, MHC clase I y MHC clase II. Las moléculas MHC clase I presentan antígenos a linfocitos T CD8+ específicos y las moléculas MHC clase II presentan antígenos a linfocitos T CD4+ específicos. Los antígenos administrados exógenamente a las APC se procesan principalmente para asociación con MHC clase II. A diferencia, los antígenos administrados endógenamente a las APC se procesan principalmente para asociación a MHC clase I.

Como se usa en el presente documento, el término "agente inmunoestimulante" incluye, pero no se limita a, compuestos capaces de estimular APCs, tales como DCs y macrófagos. Por ejemplo, agentes inmunoestimulantes adecuados para su uso en la presente invención son capaces de estimular APCs, de manera que se acelera el proceso de maduración de APCs, aumenta la proliferación de APCs, y/o se regula por incremento la incorporación o liberación de moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD80, CD86, ICAM-1, moléculas MHC y CCR7) y citocinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-15 e IFN- $\gamma$ ). Los agentes inmunoestimulantes adecuados también son capaces de aumentar la proliferación de linfocitos T. Tales agentes inmunoestimulantes incluyen, pero no se limitan a, ligando CD40; ligando FLT3; citocinas, tales como IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-2; factores estimulantes de colonias, tales como G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) y GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos); un anticuerpo anti-CTLA-4, anticuerpo anti-PD1, anticuerpo anti-41BB, o anticuerpo anti-OX-40; LPS (endotoxina); ARNm; ARNbc; Bacille Calmette-Guerin (BCG); clorhidrato de levamisol; e inmunoglobulinas intravenosas. En una realización, un agente inmunoestimulante puede ser un agonista del receptor tipo Toll (TLR). Por ejemplo, el agente inmunoestimulante puede ser un agonista de TLR3 tal como un polinucleótido de inosina:citosina bicatenario (Poly I:C, por ejemplo, disponible como Ampligen<sup>TM</sup> de Hemispherx Bipharma, PA, EE.UU., o Poly IC:LC de Oncovir) o Poly A:U; un agonista de TLR4 tal como monofosforil lípido A (MPL) o RC-529 (por ejemplo, disponible de GSK, RU); un agonista de TLR5 tal como flagelina; un agonista de TLR7 o TLR8 tal como una imidazoquinolina; agonista de TLR7 o TLR8, por ejemplo, imiquimod (por ejemplo, Aldara<sup>TM</sup>) o resiquimod y agentes de imidazoquinolina relacionados (por ejemplo, como los disponibles de 3M Corporation); o un agonista de TLR9 tal como un desoxinucleótido con motivos CpG no metilados (llamados "CpG", por ejemplo, como los disponibles de Coley Pharmaceutical). Un agente inmunoestimulante preferido es un agonista

de TLR3, preferentemente Poly I:C. Tales agentes inmunoestimulantes pueden administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente con los anticuerpos y construcciones de la presente invención y pueden también unirse físicamente a los anticuerpos y construcciones.

5 Como se usa en el presente documento, el término "unido" se refiere a la asociación de dos o más moléculas. El enlace puede ser covalente o no covalente. El enlace también puede ser genético (es decir, fusionado recombinantemente). Tales enlaces pueden lograrse usando una amplia variedad de técnicas reconocidos en la técnica, tales como conjugación química y producción de proteínas recombinantes.

10 Como se usa en el presente documento, el término "presentación cruzada" de antígeno se refiere a la presentación de antígenos de proteínas exógenas a linfocitos T por medio de moléculas MHC clase I y clase II en APCs.

15 Como se usa en el presente documento, el término "respuesta mediada por linfocitos T" se refiere a cualquier respuesta mediada por linfocitos T, que incluye linfocitos T efectores (por ejemplo, células CD8<sup>+</sup>) y linfocitos T cooperadores (por ejemplo, células CD4<sup>+</sup>). Las respuestas mediadas por linfocitos T incluyen, por ejemplo, citotoxicidad y proliferación de linfocitos T.

20 Como se usa en el presente documento, el término "respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL)" se refiere a una respuesta inmunitaria inducida por linfocitos T citotóxicos. Las respuestas de CTL están mediadas principalmente por linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

25 Como se usa en el presente documento, los términos "inhibe" o "bloquea" (por ejemplo, con referencia a la inhibición/bloqueo de la unión de CD70 a CD27 en células) se usan indistintamente y engloban tanto inhibición/bloqueo parcial como completo. La inhibición/bloqueo de CD70 reduce o altera preferentemente el nivel normal o el tipo de actividad que se produce cuando la unión CD70 se produce sin inhibición o bloqueo. Se pretende que la inhibición y bloqueo también incluyan cualquier disminución medible en la afinidad de unión de CD70 cuando entra en contacto con un anticuerpo anti-CD27 en comparación con CD70 que no está en contacto con un anticuerpo anti-CD27, por ejemplo, inhibe la unión de CD70 al menos aproximadamente el 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 %. En una realización preferida, el anticuerpo anti-CD27 inhibe la unión de CD70 al menos aproximadamente el 70 %. En otra realización, el anticuerpo anti-CD27 inhibe la unión de CD70 al menos el 80 %.

35 Como se usa en el presente documento, el término "inhibe el crecimiento" (por ejemplo, con referencia a células) pretende incluir cualquier disminución medible en el crecimiento de una célula, por ejemplo, la inhibición del crecimiento de una célula al menos aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 99 % o el 100 %.

40 Los términos "inducir una respuesta inmunitaria" y "mejorar una respuesta inmunitaria" se usan indistintamente y se refieren a la estimulación de una respuesta inmunitaria (es decir, tanto pasiva como adaptativa) a un antígeno particular. El término "induce", como se usa con respecto a inducir CDC o ADCC, se refiere a la estimulación de mecanismos particulares de destrucción celular directa. Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo induce al menos aproximadamente el 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o el 60 % de lisis por medio de CDC de células que expresan CD27 a una concentración de 10 µg/ml. En una realización preferida, el anticuerpo induce al menos aproximadamente el 40 % de lisis por medio de CDC de células que expresan CD27 a una concentración de 10 µg/ml. En otra realización, el anticuerpo induce al menos aproximadamente el 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 o el 85 % de lisis por medio de ADCC (es decir, lisis específica) de células que expresan CD27 a una concentración de 10 µg/ml. En una realización preferida, el anticuerpo induce al menos aproximadamente el 40 % de lisis por medio de ADCC de células que expresan CD27 a una concentración de 10 µg/ml.

50 Los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento", como se usan en el presente documento, se refieren a medidas terapéuticas o preventivas descritas en el presente documento. Los métodos de "tratamiento" emplean la administración a un sujeto, en necesidad de tal tratamiento, de un anticuerpo humano de la presente invención, por ejemplo, un sujeto en necesidad de una respuesta inmunitaria mejorada contra un antígeno particular o un sujeto que finalmente pueda adquirir un trastorno tal, con el fin de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad de o mejorar uno o más síntomas del trastorno o trastorno recurrente, o con el fin de prolongar la supervivencia de un sujeto más allá de la esperada en ausencia de dicho tratamiento.

60 El término "dosis eficaz" o "dosificación eficaz" se define como una cantidad suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el efecto deseado. El término "dosis terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad del trastorno que esté tratándose y del estado general del sistema inmunitario del paciente.

65 El término "paciente" incluye seres humanos y otros sujetos animales que reciben tanto tratamiento profiláctico como terapéutico.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. Por ejemplo, los anticuerpos y composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar un sujeto con un trastorno inmunitario. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

En las siguientes subsecciones se describen diversos aspectos de la invención en más detalle.

#### I. Producción de anticuerpos para CD27

La presente invención engloba anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos completamente humanos que se unen a CD27, por ejemplo, CD27 humana, como se ha definido anteriormente. Anticuerpos monoclonales que se unen a CD27 a modo de ejemplo incluyen 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8 y 1G5. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse usando una variedad de técnicas conocidas, tales como técnica de hibridación celular somática estándar descrita por Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación celular somática, en principio, también pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B, técnica de presentación en fagos usando bibliotecas de genes de anticuerpos humanos.

Por consiguiente, en un caso, se usa un método de hibridoma para producir un anticuerpo que se une a CD27 humana. En este método, un ratón u otro animal huésped apropiado puede inmunizarse con un antígeno adecuado con el fin de provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al antígeno usado para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Los linfocitos pueden fusionarse luego con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). El medio de cultivo en el que las células de hibridoma están creciendo se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse por métodos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de ascitis en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden separarse del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

En otro caso, los anticuerpos y porciones de anticuerpo que se unen a CD27 humana pueden aislarse de bibliotecas de fago de anticuerpo generadas utilizando técnicas descritas en, por ejemplo, McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991), Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) y Hoet et al (2005) Nature Biotecnología 23, 344-348; las patentes de EE.UU. N.º 5.223.409; 5.403.484; y 5.571.698 a Ladner et al.; las patentes de EE.UU. N.º 5.427.908 y 5.580.717 a Dower et al.; las patentes de EE.UU. N.º 5.969.108 y 6.172.197 a McCafferty et al.; y las patentes de EE.UU. N.º 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081 a Griffiths et al. Adicionalmente, puede usarse la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) por barajado de cadenas (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), además de infección combinatoria y recombinación *in vivo* como una estrategia para construir bibliotecas de fago muy grandes (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)).

En un caso particular, el anticuerpo que se une a CD27 humana se produce usando la técnica de presentación en fagos descrita por Hoet et al., arriba. Esta técnica implica la generación de una biblioteca de Fab humanos que tiene una única combinación de secuencias de inmunoglobulinas aisladas de donantes humanos y que tienen diversidad sintética en las CDRs de cadena pesada se genera. La biblioteca se criba entonces para Fabs que se unen a CD27 humana.

El sistema animal preferido para generar hibridomas que produce anticuerpos es el sistema murino. En la técnica es muy conocida la producción de hibridomas en el ratón, que incluye protocolos de inmunización y técnicas para aislar y fusionar esplenocitos inmunizados.

En un caso, los anticuerpos dirigidos contra CD27 se generan usando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmunitario humano en vez del sistema del ratón. En un caso, se emplean ratones transgénicos, denominados en el presente documento "ratones HuMAb" que contienen un minilocus de gen de la inmunoglobulina humano que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada ( $\mu$  y  $\gamma$ ) y ligera  $\kappa$  humanas no reordenadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de la cadena  $\mu$  y  $\gamma$  (Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones presentan expresión reducida de IgM o  $\kappa$  de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes introducidos de cadena pesada y ligera humanas experimentan cambio de clase y mutación somática para generar anticuerpos monoclonales IgGk de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994), arriba; revisado en Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol. 13: 65-93, y Harding, F. and Lonberg, N. (1995)

Ann. N. Y. Acad. Sci 764:536-546). La preparación de ratones HuMAb se describe en detalle en la Sección II más adelante y en Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaille et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaille et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg et al., (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. Véanse también las patentes de EE.UU. N.º 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299 y 5.770.429, todas de Lonberg and Kay, y GenPharm International; la patente de EE.UU. N.º 5.545.807 de Surani et al.; publicación internacional N.º WO 98/24884, publicada el 11 de junio de 1998; WO 94/25585, publicada el 10 de noviembre de 1994; WO 93/1227, publicada el 24 de junio de 1993; WO 92/22645, publicada el 23 de diciembre de 1992; WO 92/03918, publicada el 19 de marzo de 1992.

### 15 *Inmunizaciones*

Para generar anticuerpos completamente humanos para CD27, pueden inmunizarse ratones transgénicos o transcromosómicos que contienen genes de la inmunoglobulina humana (por ejemplo, ratones HCo12, HCo7 o KM) con una preparación purificada o enriquecida del antígeno CD27 y/o células que expresan CD27, como se describe, por ejemplo, en Lonberg et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 y el documento WO 98/24884. Como se describe en el presente documento, los ratones HuMAb se inmunizan tanto con proteínas CD27 recombinantes como líneas celulares que expresan CD27 como inmunógenos. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con CD27 humana que codifica ADN. Preferentemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, puede usarse una preparación purificada o enriquecida (5-50 µg) del antígeno CD27 recombinante para inmunizar los ratones HuMAb por vía intraperitoneal. En el supuesto caso de que las inmunizaciones usando una preparación purificada o enriquecida del antígeno CD27 no produzcan anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan CD27, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunitarias. Líneas celulares a modo de ejemplo incluyen líneas celulares CHO y Raji estables que expresan en exceso CD27.

La experiencia acumulada con diversos antígenos ha demostrado que los ratones transgénicos HuMAb responden mejor cuando se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal (IP) o por vía subcutánea (SC) con el antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP/SC cada dos semanas (hasta un total de 10) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmunitaria puede monitorizarse durante el transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma que se obtienen por sangrados retroorbitales. El plasma puede cribarse por ELISA (tal como se describe a continuación), y pueden usarse ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-CD27 para las fusiones. Los ratones pueden reforzarse por vía intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y extracción del bazo.

### 40 *Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales para CD27*

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales para CD27, pueden aislarse esplenocitos y células de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse con una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden entonces cribarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Por ejemplo, pueden fusionarse suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con células de mieloma de ratón que no secretan SP2/0-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con 50 % de PEG (p/v). Las células pueden sembrarse a aproximadamente  $1 \times 10^5$  en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene, además de los reactivos comunes, 10 % de suero de clon fetal, 5-10 % de factor de clonación de hibridomas Origen (IGEN) y 1X HAT (Sigma). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en medio en el que HAT se sustituye con HT. Los pocillos individuales pueden entonces cribarse mediante ELISA para anticuerpos IgM e IgG monoclonales anti-CD27 humanos o para unirse a la superficie de células que expresan CD27, por ejemplo, una línea celular CHO que expresa CD27, mediante FLISA (ensayo inmunoabsorbente unido a fluorescencia). Una vez se produce el extenso crecimiento de hibridomas, el medio puede observarse normalmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden volver a sembrarse, volver a cribarse, y si siguen siendo positivos para IgG, anticuerpos monoclonales anti-CD27 pueden subclonarse al menos dos veces mediante dilución limitante. Los subclones estables pueden entonces cultivarse *in vitro* para generar anticuerpo en medio de cultivo de tejido para su caracterización.

### 60 *Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales para CD27*

También pueden producirse anticuerpos de la invención en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como es muy conocido en la técnica (Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

65

Por ejemplo, en una realización, el (los) gen(es) de interés, por ejemplo, genes de anticuerpo humano, pueden unirse en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como se usa por el sistema de expresión de genes GS desvelado en los documentos WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841, u otros sistemas de expresión muy conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpo clonado puede introducirse en células huésped eucariotas tales como células CHO o células NSO o alternativamente otras células eucariotas como células derivadas de plantas, células de hongos o levadura. El método usado para introducir estos genes podrían ser métodos los métodos descritos en la técnica tales como electroporación, lipofectina, lipofectamina u otros. Después de introducir estos genes de anticuerpo en las células huésped, pueden identificarse y seleccionarse células que expresan el anticuerpo. Estas células representan los transfectomas que pueden luego amplificarse para su nivel de expresión y subir de nivel para producir anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes pueden aislarse y purificarse a partir de estos sobrenadantes y/o células de cultivo.

Alternativamente, estos genes de anticuerpo clonado pueden expresarse en otros sistemas de expresión tales como *E. coli* o en organismos completos o pueden expresarse sintéticamente.

#### *Uso de secuencias de anticuerpo parciales para expresar anticuerpos intactos*

Los anticuerpos interaccionan con antígenos diana predominantemente mediante restos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadena pesada y ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDRs son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos específicos que existen de forma natural construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo específico que existe de forma natural injertadas en secuencias de la región estructural de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al., 1998, Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986, Nature 321:522-525; y Queen, C. et al., 1989, Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033). Tales secuencias de la región estructural pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal se diferenciarán de secuencias de genes de anticuerpos maduros debido a que no incluirán genes variables completamente ensamblados, que se forman mediante la unión de V(D)J durante la maduración de linfocitos B. Las secuencias de genes de la línea germinal también se diferenciarán de las secuencias de un anticuerpo de repertorio secundario de alta afinidad en individuos uniformemente a través de la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente poco frecuentes en la porción del extremo amino de la región estructural. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente poco frecuentes en la porción del extremo amino de la región estructural 1 y en la porción del extremo carboxi de la región estructural 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por este motivo, no es necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo particular con el fin de recrear un anticuerpo recombinante intacto que tiene propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento PCT/US99/05535 presentado el 12 de marzo de 1999). La secuencia de cadena pesada y ligera parcial que engloba las regiones CDR es normalmente suficiente para este fin. Se usa la secuencia parcial para determinar qué segmentos de genes variables y de unión de la línea germinal contribuyeron a los genes variables de anticuerpo recombinado. La secuencia de la línea germinal se usa luego para llenar porciones ausentes de las regiones variables. Las secuencias conductoras de cadena pesada y ligera se escinden durante la maduración de proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias ausentes, pueden combinarse secuencias de ADN clonadas con oligonucleótidos sintéticos mediante ligación o amplificación por PCR. Alternativamente, la región variable completa puede sintetizarse como un conjunto de oligonucleótidos cortos que se superponen y combinarse mediante amplificación por PCR para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene ciertas ventajas tales como eliminación o inclusión o sitios de restricción particulares u optimización de codones particulares.

Las secuencias de nucleótidos de transcritos de cadena pesada y ligera de un hibridoma se usan para diseñar un conjunto que se superpone de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos idénticas a las de las secuencias naturales. Las secuencias de cadena pesada y kappa sintéticas pueden diferenciarse de las secuencias naturales en tres formas: se interrumpen cadenas de bases de nucleótido repetidas para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; se incorporan sitios de iniciación de la traducción óptimos según las reglas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870) y se manipulan sitios HindIII en la dirección 5' de los sitios de iniciación de la traducción.

Tanto para las regiones variables de cadena pesada como ligera, las secuencias de cadena codificante optimizada y no codificante correspondiente se fragmentan en 30 - 50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del oligonucleótido no codificante correspondiente. Así, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblarse en conjuntos bicatenarios superpuestos que abarcan segmentos de 150 - 400 nucleótidos. Los conjuntos se usan entonces como moldes para producir productos de amplificación por PCR de 150 - 400 nucleótidos. Normalmente, un único conjunto de oligonucleótidos de región variable se fragmentará en dos conjuntos que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR que se superponen. Estos productos que se superponen se combinan entonces mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede desearse incluir

un fragmento que se superpone de la región constante de cadena pesada o ligera (que incluye el sitio BbsI de la cadena ligera kappa o el sitio AgeI si es la cadena pesada gamma) en la amplificación por PCR para generar fragmentos que pueden clonarse fácilmente en las construcciones de vector de expresión.

5 Las regiones variables de cadena pesada y ligera reconstruidas se combinan entonces con el promotor clonado, secuencia conductora, iniciación de la traducción, secuencia conductora, secuencia de región constante, 3' no traducida, poliadenilación y terminación de la transcripción para formar construcciones de vector de expresión. Las construcciones de expresión de cadena pesada y ligera pueden combinarse en un único vector, co-transfectarse, transfectarse en serie o transfectarse por separado en células huésped que luego se fusionan para formar una célula huésped que expresa ambas cadenas.

15 Se construyeron plásmidos para su uso en la construcción de vectores de expresión de forma tal que las secuencias de ADNc de cadena pesada V y ligera kappa amplificadas por PCR pudieran usarse para la reconstrucción de minigenes de cadena pesada y ligera completos. Estos plásmidos pueden usarse para expresar anticuerpos IgG<sub>1</sub>κ o IgG<sub>4</sub>κ completamente humanos. Los anticuerpos completamente humanos y quiméricos de la presente invención también incluyen anticuerpos IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM e IgD. Pueden construirse plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

20 Así, las características estructurales de los anticuerpos anti-CD27 de la invención puede usarse para crear anticuerpos anti-CD27 estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tales como, por ejemplo,

- 25 (1) inhiben (por ejemplo, bloquean completa o parcialmente) la unión de CD70 a células que expresan CD27 al menos aproximadamente el 70 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 70 % o al menos el 70 %, a una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml);
- (2) se unen a CD27 humana con una constante de disociación en equilibrio Kd de 10<sup>-9</sup> M o menos o, alternativamente, una constante de asociación en equilibrio Ka de 10<sup>+9</sup> M<sup>-1</sup> o mayor
- 30 (3) inducen al menos aproximadamente el 30 % de citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) de células que expresan CD27 a una concentración de 10 µg/ml (o inducen al menos el 30 % o al menos aproximadamente el 40 % o al menos el 40 % de CDC de células que expresan CD27 a una concentración de 10 µg/ml);
- (4) inducen al menos aproximadamente el 30 % de lisis mediada por ADCC específica de células que expresan CD27 a una concentración de 10 µg/ml (o inducen al menos el 30 % o al menos aproximadamente el 40 % o al menos el 40 % de lisis mediada por ADCC específica de células que expresan CD27 a una concentración de 10 µg/ml);
- 35 (5) previenen o inhiben el crecimiento de células tumorales que expresan CD27 en un modelo de xenoinjerto (por ejemplo, reducen el tamaño del tumor en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) al menos aproximadamente el 50 % 20 días después de la inoculación de células tumorales *in vivo* a 0,5 mg ip en al menos 6 días);
- 40 (6) inducen o mejoran las respuestas inmunitarias específicas del antígeno cuando se combinan con una vacuna u otro antígeno;
- (7) inducen o mejoran las respuestas inmunitarias, en particular, pero no se limitan a, respuestas inmunitarias TH1;
- 45 (8) inducen o mejoran la actividad de linfocitos T, en particular, pero no se limitan a, números de linfocitos T CD8+ específicos o actividad funcional o proliferación o activación de linfocitos T y/o
- (9) reducen o inhiben la proliferación o activación de los linfocitos T. En una realización, las regiones CDR de los anticuerpos de la invención pueden combinarse recombinantemente con regiones estructurales conocidas y CDRs para crear anticuerpos anti-CD27 adicionales modificados recombinantemente de la invención. Las regiones estructurales variables de cadena pesada y ligera pueden derivar de las mismas secuencias de anticuerpos o secuencias diferentes. Las secuencias de anticuerpos pueden ser las secuencias de anticuerpos que existen de forma natural o pueden ser secuencias consenso de varios anticuerpos. Véase Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger et al., Protein Engineering 6:971 (1993) y Carter et al., documento WO 92/22653.

55 También se describe en el presente documento un método de preparación de un anticuerpo anti-CD27 que incluye: preparar un anticuerpo que incluye (1) regiones estructurales de cadena pesada y CDRs de cadena pesada, donde al menos una de las CDRs de cadena pesada incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de las CDRs mostradas en SEQ ID NOs: 8, 9, 10, 26, 27, 28, 38, 39, 40, 50, 51, 52, 62, 63, 64, 74, 75, 76, 86, 87, 88, 104, 105, 106; y (2) regiones estructurales de cadena ligera y CDRs de cadena ligera, donde al menos una de las CDRs de cadena ligera incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada de las secuencias de aminoácidos de las CDRs mostradas en SEQ ID NOs: SEQ ID NOs: 14, 15, 16, 20, 21, 22, 32, 33, 34, 44, 45, 46, 56, 57, 58, 68, 69, 70, 80, 81, 82, 92, 93, 94, 98, 99, 100, 110, 111, 112; donde el anticuerpo retiene la capacidad para unirse a CD27. La capacidad del anticuerpo para unirse a CD27 puede determinarse usando ensayos de unión estándar, tales como aquellos expuestos en los ejemplos (por ejemplo, un ELISA o un FLISA).

Es muy conocido en la técnica que los dominios de CDR3 de cadena pesada y ligera del anticuerpo desempeñan una función particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno (véase, Hall et al., J. Immunol., 149:1605-1612 (1992); Polymenis et al., J. Immunol., 152:5318-5329 (1994); Jahn et al., Immunobiol., 193:400-419 (1995); Klimka et al., Brit. J. Cancer, 83:252-260 (2000); Beiboer et al., J. Mol. Biol., 296:833-849 (2000); Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:8910-8915 (1998); Barbas et al., J. Am. Chem. Soc., 116:2161-2162 (1994); Ditzel et al., J. Immunol., 157:739-749 (1996)). Por consiguiente, los anticuerpos recombinantes de la invención preparados como se expone anteriormente preferentemente comprenden las CDR3s de cadena pesada y/o ligera de anticuerpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8 y 1G5. Los anticuerpos pueden comprender además las CDR2s de los anticuerpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8 y 1G5. Los anticuerpos pueden comprender además las CDR1s de los anticuerpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8 y 1G5. Los anticuerpos pueden comprender además cualquier combinación de las CDRs.

También se describen en el presente documento anticuerpos anti-CD27 que comprenden: (1) regiones estructurales de la cadena pesada, una región CDR1 de la cadena pesada, una región CDR2 de la cadena pesada y una región CDR3 de la cadena pesada, en las que la región CDR3 de la cadena pesada se selecciona de las CDR3s de 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8 y 1G5 y (2) regiones estructurales de la cadena ligera, una región CDR1 de la cadena ligera, una región CDR2 de la cadena ligera y una región CDR3 de la cadena ligera, en las que la región CDR3 de cadena ligera se selecciona de las CDR3s de 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8 y 1G5, en las que el anticuerpo se une a CD27. El anticuerpo puede incluir además la CDR2 de la cadena pesada y/o la CDR2 de la cadena ligera de los anticuerpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8 y 1G5. El anticuerpo puede comprender además la CDR1 de la cadena pesada y/o la CDR1 de la cadena ligera de los anticuerpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8 y 1G5.

#### *Generación de anticuerpos que tienen secuencias modificadas*

En otra realización, las secuencias de la región variable, o porciones de la misma, de los anticuerpos anti-CD27 de la invención se modifican para crear anticuerpos anti-CD27 estructuralmente relacionados que retienen la unión (es decir, al mismo epítipo que el anticuerpo no modificado) y, por lo tanto, son funcionalmente equivalentes. Métodos de identificación de residuos que pueden alterarse sin eliminar la unión al antígeno son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Marks et al. (Biotechnology (1992) 10(7):779-83 (diversificación de anticuerpos monoclonales mediante barajado de regiones variables de la cadena ligera, luego regiones variables de la cadena pesada con cambios de secuencias de CDR3 fijos), Jaspers et al. (1994) Biotechnology 12(9):899-903 (selección de anticuerpos humanos de repertorios de presentación en fagos a un único epítipo de un antígeno), Sharon et al. (1986) PNAS USA 83(8):2628-31 (mutagénesis dirigida al sitio de un resto de aminoácido invariable en la unión de segmentos de diversidad variable de un anticuerpo); Casson et al. (1995) J. Immunol. 155(12):5647-54 (evolución de pérdida y cambio de especificidad resultante de mutagénesis al azar de una región variable de cadena pesada de anticuerpo).

Por consiguiente, las regiones CDR1, 2 y/o 3 de los anticuerpos manipulados descritos anteriormente pueden comprender la(s) secuencia(s) de aminoácidos exacta(s) como la(s) de los anticuerpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8 y 1G5 desveladas en el presente documento. Sin embargo, en otros casos, los anticuerpos comprenden derivados de las secuencias de CDR exactas de 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8 y 1G5, pero todavía retienen la capacidad de unirse a CD27 eficazmente. Tales modificaciones de secuencias pueden incluir una o más adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificaciones de secuencia conservativas como ha descrito anteriormente. Las modificaciones de secuencia también pueden basarse en las secuencias consenso descritas anteriormente para las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 particulares de los anticuerpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8 y 1G5.

Por consiguiente, el anticuerpo modificado puede estar compuesto de una o más CDRs que son, por ejemplo, el 90 %, 95 %, 98 % o el 99,5 % idénticas a una o más CDRs de los anticuerpos 1F5, 1H8, 3H12, 3A10, 2C2, 2G9, 3H8 y 1G5. También se pretende que estén englobados intervalos intermedios a los valores anteriormente citados, por ejemplo, CDRs que son el 90-95 %, 95-98 % o el 98-100 % de identidad idéntica a una o más de las secuencias.

Puede alterarse uno o más residuos de una CDR para modificar la unión para lograr una constante de asociación de unión más favorecida y una constante de disociación de unión más favorecida, o ambas, de forma tal que se logre una constante de unión idealizada. Usando esta estrategia puede lograrse un anticuerpo que tiene una afinidad de unión ultra-alta de, por ejemplo,  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  o más. Pueden usarse técnicas de maduración de afinidad, muy conocidas en la técnica y aquellas descritas en el presente documento, para alterar una o más regiones CDR(s), seguido de cribado de las moléculas de unión resultantes para el cambio deseado en la unión. Por consiguiente, a medida que se alteran la(s) CRD(s), pueden monitorizarse los cambios en la afinidad de unión, además de la inmunogenicidad, y puntuarse de forma que se logre un anticuerpo optimizado para la mejor unión combinada y baja inmunogenicidad.

Además de o en lugar de las modificaciones dentro de las CDRs, también pueden hacerse modificaciones dentro de una o más de las regiones estructurales FR1, FR2, FR3 y FR4, de las regiones variables de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo, siempre que estas modificaciones no eliminen la afinidad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más restos de aminoácidos que no son de la línea germinal en las regiones estructurales de la región variable de cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo de la invención se sustituyen con un resto de aminoácidos de

la línea germinal, es decir, el resto de aminoácidos correspondiente en la secuencia de la línea germinal humana para la región variable de cadena pesada o ligera, con el que el anticuerpo tiene identidad de secuencia significativa. Por ejemplo, puede alinearse una cadena de anticuerpo con una cadena de anticuerpo de la línea germinal con la que comparte identidad de secuencia significativa y los restos de aminoácidos que no se corresponden entre la secuencia de la región estructural del anticuerpo y la región estructural de la cadena de la línea germinal pueden sustituirse con restos correspondientes de la secuencia de la línea germinal. Cuando un aminoácido se diferencia entre una región estructural variable de un anticuerpo y una región estructural variable de la secuencia de la línea germinal humana equivalente, el aminoácido de la región estructural del anticuerpo debe normalmente sustituirse con el aminoácido de la secuencia de la línea germinal humana equivalente si se espera razonablemente que el aminoácido entre dentro de una de las siguientes categorías:

- (1) un resto de aminoácido que une no covalentemente el antígeno directamente,
- (2) un resto de aminoácido que es adyacente a una región CDR,
- (3) un resto de aminoácido que interacciona de otro modo con una región CDR (por ejemplo, está dentro de aproximadamente 3-6 Å de una región CDR como se ha determinado por modelado informático) o
- (4) un resto de aminoácido que participa en la interfase VL-VH.

Restos que "unen no covalentemente el antígeno directamente" incluyen aminoácidos en las posiciones en regiones estructurales que tienen una buena probabilidad de interactuar directamente con los aminoácidos en el antígeno según fuerzas químicas establecidas, por ejemplo, por enlace de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrófobas y similares. Por consiguiente, en una realización, un resto de aminoácido en la región estructural de un anticuerpo de la invención está sustituido con el resto de aminoácido de la línea germinal correspondiente que une no covalentemente el antígeno directamente.

Restos que están "adyacentes a una región CDR" incluyen restos de aminoácidos en posiciones inmediatamente adyacentes a una o más de las CDRs en la secuencia primaria del anticuerpo, por ejemplo, en las posiciones inmediatamente adyacentes a una CDR como se define por Kabat o una CDR como se define por Chothia (véase, por ejemplo, Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901 (1987)). Por consiguiente, en una realización, un resto de aminoácido dentro de la región estructural de un anticuerpo de la invención está sustituido con un resto de aminoácido de la línea germinal correspondiente que es adyacente a una región CDR.

Restos que "interaccionan de otra manera con una región CDR" incluyen aquellos que se determina mediante análisis estructural secundario que están en una orientación espacial suficiente como para afectar una región CDR. Tales aminoácidos generalmente tendrán un átomo de cadena lateral dentro de aproximadamente 3 unidades de angstrom (Å) de algún átomo en las CDRs y deben contener un átomo que podría interactuar con los átomos de CDR según fuerzas químicas establecidas, tales como aquellas enumeradas anteriormente. Por consiguiente, en una realización, un resto de aminoácido dentro de la región estructural de un anticuerpo de la invención está sustituido con el resto de aminoácido de la línea germinal correspondiente que interacciona de otro modo con una región CDR.

Se sabe que los aminoácidos en varias posiciones en la región estructural son importantes para determinar la confirmación de CDR (por ejemplo, capaces de interactuar con las CDRs) en muchos anticuerpos (Chothia and Lesk, arriba, Chothia et al., arriba, y Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990)). Estos autores identificaron restos de la región estructural conservados importantes para la conformación de CDR mediante el análisis de las estructuras de varios anticuerpos conocidos. Los anticuerpos analizados se encontraban en un número limitado de clases estructurales o "canónicas" basándose en la conformación de las CDRs. Los restos de la región estructural conservados dentro de los miembros de una clase canónica se denominan restos "canónicos". Los restos canónicos incluyen los restos 2, 25, 29, 30, 33, 48, 64, 71, 90, 94 y 95 de la cadena ligera y los restos 24, 26, 29, 34, 54, 55, 71 y 94 de la cadena pesada. Pueden identificarse restos adicionales (por ejemplo, restos que determinan la estructura de CDR) según la metodología de Martin and Thorton (1996) J. Mol. Biol. 263:800. En particular, se sabe que los aminoácidos en las posiciones 2, 48, 64 y 71 de la cadena ligera y 26-30, 71 y 94 de la cadena pesada (enumeración según Kabat) son capaces de interactuar con las CDRs en muchos anticuerpos. También es probable que los aminoácidos en las posiciones 35 en la cadena ligera y 93 y 103 en la cadena pesada interaccionen con las CDRs. Pueden identificarse restos adicionales que pueden afectar la conformación de las CDRs según la metodología de Foote y Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487. Tales restos se denominan restos "vernier" y son aquellos restos en la región estructural que subyacen cerca de (es decir, forman una "plataforma" por debajo de) las CDR.

Los restos que "participan en la interfase VL-VH" o "restos de relleno" incluyen aquellos restos en la interfase entre VL y VH como se define, por ejemplo, en Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985) o Chothia et al., arriba.

Ocasionalmente, existe cierta ambigüedad acerca de si un aminoácido particular está dentro de una o más de las categorías anteriormente mencionadas. En tales casos, se producen anticuerpos variantes alternativos, uno de los cuales tiene esa sustitución particular, el otro no la tiene. Los anticuerpos variantes alternativos así producidos pueden probarse en cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento para la actividad deseada y el

anticuerpo preferido seleccionado.

Candidatos adicionales para la sustitución dentro de la región estructural son los aminoácidos que son poco usuales o "raros" para un anticuerpo en esa posición. Estos aminoácidos pueden sustituirse con aminoácidos de la posición equivalente de la secuencia de la línea germinal humana o de posiciones equivalentes de anticuerpos más típicos. Por ejemplo, la sustitución puede ser deseable cuando el aminoácido en una región estructural del anticuerpo es raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la secuencia de la línea germinal es común para esa posición en las secuencias de inmunoglobulina; o cuando el aminoácido en el anticuerpo es raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la secuencia de la línea germinal también es raro, con respecto a otras secuencias. Se contempla que sustituyendo un aminoácido poco usual con un aminoácido de la secuencia de la línea germinal que es típico para los anticuerpos, el anticuerpo puede hacerse menos inmunogénico.

El término "raro", como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que se produce en esa posición en menos de aproximadamente el 20 %, preferentemente menos de aproximadamente el 10 %, más preferentemente menos de aproximadamente el 5 %, incluso más preferentemente menos de aproximadamente el 3 %, incluso más preferentemente menos de aproximadamente el 2 % e incluso más preferentemente menos de aproximadamente el 1 % de secuencias en una muestra de secuencias representativa y el término "común", como se usa en el presente documento, indica un aminoácido que se produce en más de aproximadamente el 25 % pero normalmente más de aproximadamente el 50 % de secuencias en una muestra representativa. Por ejemplo, todas las secuencias de región variable de cadena ligera y pesada se agrupan respectivamente en "subgrupos" de secuencias que son especialmente homólogos unos con respecto a los otros y tienen los mismos aminoácidos en ciertas posiciones críticas (Kabat et al., arriba). Cuando se decide si un aminoácido en una secuencia de anticuerpo es "raro" o "común" entre las secuencias, frecuentemente será preferible considerar solo aquellas secuencias en el mismo subgrupo que la secuencia de anticuerpo.

En general, las regiones estructurales de los anticuerpos son normalmente sustancialmente idénticas, y más sustancialmente, idénticas a las regiones estructurales de las secuencias de línea germinal humana de la que derivaron. Por supuesto, muchos de los aminoácidos en la región estructural hacen una contribución pequeña, o no directa, a la especificidad o afinidad de un anticuerpo. Así, muchas sustituciones conservativas individuales de los restos de la región estructural pueden ser toleradas sin un cambio apreciable de la especificidad o afinidad de la inmunoglobulina resultante. Así, en una realización, la región estructural variable del anticuerpo comparte al menos el 85 % de identidad de secuencia con una secuencia de la región estructural variable de la línea germinal humana o consenso de tales secuencias. En otra realización, la región estructural variable del anticuerpo comparte al menos el 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad de secuencia con una secuencia de la región estructural variable de la línea germinal humana o consenso de tales secuencias.

Además de simplemente unirse a CD27, un anticuerpo puede seleccionarse por su retención de otras propiedades funcionales de anticuerpos de la invención, tales como, por ejemplo:

- (1) inhibe (por ejemplo, bloquea completa o parcialmente) la unión de CD70 a células que expresan CD27 al menos aproximadamente el 70 %;
- (2) se une a CD27 humana con una constante de disociación en equilibrio  $K_d$  de  $10^{-9}$  M o menos o, alternativamente, una constante de asociación en equilibrio  $K_a$  de  $10^{+9}$   $M^{-1}$  o mayor;
- (3) induce al menos aproximadamente el 40 % de citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) de células que expresan CD27 a una concentración de 10  $\mu$ g/ml y/o
- (4) induce al menos aproximadamente el 40 % de lisis específica mediada por ADCC de células que expresan CD27 a una concentración de 10  $\mu$ g/ml.

*Caracterización de anticuerpos monoclonales para CD27*

Los anticuerpos monoclonales de la invención pueden caracterizarse por unirse a CD27 usando una variedad de técnicas conocidas. Generalmente, los anticuerpos se caracterizan inicialmente por ELISA. Brevemente, pueden recubrirse placas de microtitulación con CD27 purificada en PBS, y luego bloquearse con proteínas irrelevantes tales como albúmina en suero bovino (BSA) diluida en PBS. Se añaden diluciones de plasma de ratones inmunizados con CD27 a cada pocillo y se incuban durante 1-2 horas a 37 °C. Las placas se lavan con PBS/Tween 20 y luego se incuban con reactivo policlonal específico de Fc anti-IgG humana de cabra conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37 °C. Después de lavar, las placas se desarrollan con sustrato ABTS y se analizan a DO de 405. Preferentemente, para las fusiones se usarán ratones que desarrollan los títulos más altos.

Puede usarse un ensayo ELISA como se ha descrito anteriormente para cribar anticuerpos y, así, hibridomas que producen anticuerpos que muestran reactividad positiva con el inmunogén CD27. Los hibridomas que se unen, preferentemente con afinidad alta, a CD27 pueden entonces subclonarse y caracterizarse adicionalmente. Entonces puede elegirse un clon de cada hibridoma, que retiene la reactividad de las células originales (por ELISA), para preparar un banco de células y para la purificación de anticuerpos.

Para purificar los anticuerpos anti-CD27, los hibridomas seleccionados pueden cultivarse en botellas de cultivo rotatorias, matraces de agitación de dos litros u otros sistemas de cultivo. Los sobrenadantes pueden filtrarse y concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) para purificar la proteína. Después del intercambio de tampón a PBS, la concentración puede determinarse por  $DO_{280}$  usando el coeficiente de extinción 1,43 o preferentemente por análisis nefelométrico. La IgG puede comprobarse por electroforesis en gel y por el método específico del antígeno.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-CD27 seleccionados se unen a epítopes únicos, cada anticuerpo puede biotinilarse usando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, IL). La unión a mAb biotinilados puede detectarse con una sonda marcada con estreptavidina. Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden realizarse ELISAs de isotipo usando técnicas reconocidas en la técnica. Por ejemplo, los pocillos de placas de microtitulación pueden recubrirse con 10  $\mu\text{g/ml}$  de anti-Ig durante la noche a 4 °C. Después de bloquear con 5 % de BSA, las placas se hacen reaccionar con 10  $\mu\text{g/ml}$  de anticuerpos monoclonales o controles de isotipos purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. Los pocillos pueden entonces hacerse reaccionar con IgG1 u otras sondas conjugadas específicas de isotipo. Las placas se desarrollan y se analizan como se ha descrito anteriormente.

Para probar la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CD27, puede usarse citometría de flujo. Brevemente, las líneas celulares y/o CMSP humanas que expresan CD27 unida a la membrana (cultivadas en condiciones normales de crecimiento) se mezclan con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene 0,1 % de BSA a 4 °C durante 1 hora. Después de lavar, las células se hacen reaccionar con anticuerpo anti-IgG marcado con fluoresceína en las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse con el instrumento FACScan usando luz y propiedades de dispersión lateral para regular células individuales y se determina la unión de los anticuerpos marcados. Puede usarse un ensayo alternativo usando microscopía de fluorescencia (además del o en vez del) ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente se ha descrito anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener sensibilidad reducida dependiendo de la densidad del antígeno.

Pueden probarse adicionalmente IgG anti-CD27 para reactividad con el antígeno CD27 por transferencia Western. Brevemente, pueden prepararse extractos celulares de células que expresan CD27 y someterse a electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida. Después de la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a membranas de nitrocelulosa, se bloquearán con 20 % de suero de ratón y se probarán con los anticuerpos monoclonales a probar. La unión a IgG puede detectarse usando fosfatasa alcalina anti-IgG y desarrollarse con pastillas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

Los métodos de análisis de la afinidad de unión, reactividad cruzada y cinética de unión de diversos anticuerpos anti-CD27 incluyen ensayos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) Biacore™ usando un instrumento Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Suecia), como se describe en el Ejemplo 2 en el presente documento.

## II. Inmunotoxinas

En otra realización, los anticuerpos de la presente invención están unidos a un resto terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco o un radioisótopo. Cuando están conjugados con una citotoxina, estos conjugados de anticuerpo se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células (por ejemplo, las mata). Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracildecabazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Un anticuerpo de la presente invención puede conjugarse con un radioisótopo, por ejemplo, yodo radiactivo, para generar radiofarmacéuticos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado con las dendritas, tal como una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, o enfermedad de injerto contra huésped.

Los conjugados de anticuerpo de la invención pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y el resto de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón- $\gamma$ ; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-

2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar tales restos terapéuticos con anticuerpos son conocidos, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery (2nd Ed.)*, Robinson et al. (eds.), pp. 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 et al. (eds.), pp. 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 et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

### III. Composiciones

En otra realización, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo, una composición que contiene uno o una combinación de anticuerpos monoclonales de la presente invención, formulados junto con un vehículo (por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable). También se proporcionan composiciones que contienen moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo de la presente invención. En una realización, las composiciones incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) anticuerpos aislados de la invención. Preferentemente, cada uno de los anticuerpos de la composición se une a un epítipo preseleccionado distinto de CD27.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con al menos uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes antiinflamatorios, DMARDs (fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad), agentes inmunosupresores y quimioterapéuticos. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse conjuntamente con radioterapia. La coadministración con otros anticuerpos también está englobada por la invención.

Como se usa en el presente documento, los términos "vehículo" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluyen todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, puede recubrirse en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

Ejemplos de adyuvantes que pueden usarse con los anticuerpos y construcciones de la presente invención incluyen: Adyuvante incompleto y adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Mich.); adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.); sales de aluminio tales como gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; sales de calcio, hierro o cinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos catiónica o aniónicamente derivatizados; polifosfacenos; microesferas biodegradables; citocinas, tales como GM-CSF, interleucina-2, -7, -12, y otros factores similares; 3D-MPL; oligonucleótido CpG; y monofosforil lípido A, por ejemplo, monofosforil lípido A 3-de-O-acilado.

Los adyuvantes MPL están disponibles en Corixa Corporation (Seattle, Wash; véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG no está metilado) son muy conocidos y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y las patentes de EE.UU. N.º 6.008.200 y 5.856.462. También se describen secuencias de ADN inmunoestimulantes, por ejemplo, Sato et al., *Science* 273:352, 1996.

Otros adyuvantes alternativos incluyen, por ejemplo, saponinas, tales como Quil A, o derivados de las mismas, que incluyen QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, Mass.); escina; digitonina; o saponinas de Gypsophila o Chenopodium quinoa; Montanide ISA 720 (Seppic, Francia); SAF (Chiron, California, Estados Unidos); ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron); la serie de adyuvantes SBAS (por ejemplo, SBAS-2 o SBAS-4, disponible en SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica); Detox (Enhanzyn™) (Corixa, Hamilton, Mont.); RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.) y otros 4-fosfatos de aminoalquilglucosaminida (AGPs); adyuvantes de polioxietilén éter tales como los descritos en el documento WO 99/52549A1; imidazoquinolinas sintéticas tales como imiquimod [S-26308, R-837] (Harrison, et al., *Vaccine* 19: 1820-1826, 2001; y resiquimod [S-28463, R-848] (Vasilakos, et al., *Cellular immunology* 204: 64-74, 2000; las bases de Schiff de carbonilos y aminas que se expresan constitutivamente sobre superficies de linfocitos T y células presentadoras de antígenos, tales como tucaresol (Rhodes, J. et al., *Nature* 377: 71-75, 1995); citocina, quimiocina y moléculas coestimuladoras como cualquier proteína o péptido, que incluyen, por ejemplo, citocinas proinflamatorias tales como Interferón, GM-CSF, IL-1 alfa, IL-1 beta, TGF-alfa y TGF-beta, inductores de Th1 tales como interferón gamma, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21, inductores de Th2 tales como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y otros genes coestimuladores y de quimiocina tales como MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta,

RANTES, TCA-3, CD80, CD86 y CD40L; agentes inmunoestimulantes que se dirigen a ligandos tales como CTLA- 4 y L-selectina, proteínas y péptidos estimuladores de la apoptosis tales como Fas; adyuvantes basados en lípidos sintéticos, tales como vaxfectina (Reyes et al., Vaccine 19: 3778-3786, 2001) escualeno, alfa-tocoferol, polisorbato 80, DOPC y colesterol; endotoxina, [LPS], (Beutler, B., Current Opinion in Microbiology 3: 23-30, 2000); ligandos que activan receptores Toll para producir citocinas inductoras de Th1, tales como lipoproteínas micobacterianas sintéticas, proteína micobacteriana p19, peptidoglicano, ácido teicoico y lípido A; y CT (toxina del cólera, subunidades A y B) y LT (enterotoxina lábil al calor de E. coli, subunidades A y B), familia de proteínas de choque térmico (HSPs) y LLO (listeriolisina O; documento WO 01/72329). Estos y varios otros agonistas del receptor tipo Toll (TLR) se describen, por ejemplo, en Kanzler et al, Nature Medicine, Mayo de 2007, Vol. 13, No 5. Un agente inmunoestimulante preferido para su uso en combinación con un anticuerpo anti-CD27 de la invención es un agonista de TLR3, tal como Poly IC.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confiere ningún efecto toxicológico no deseado (véase por ejemplo, Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19). Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición de la presente invención puede administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como será apreciado por el experto, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán al compuesto de la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas microencapsulados de liberación. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Para administrar un compuesto de la invención por ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para prevenir su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Diluyentes aceptables incluyen solución salina y soluciones de tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua, además de liposomas convencionales (Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

Los vehículos incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersión. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida de que algún medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas normalmente deben ser estériles y estables en condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un componente o una combinación de los componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración estéril. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado a vacío y el secado por congelación (liofilización) que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una solución previamente esterilizada por filtración de los mismos.

Las pautas de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas con el tiempo o la dosis puede reducir o aumentar proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden administrarse una o dos veces por semana por inyección subcutánea o intramuscular o una o dos veces al mes por inyección subcutánea o intramuscular.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que van a tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación para su uso en la invención se dictan por y son directamente dependientes de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que va a lograrse y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de combinar dicho compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para administración oral, nasal, tópica (que incluyen bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en formas de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que está tratándose y del modo particular de administración. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación única generalmente será aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por ciento, esta cantidad oscilará de aproximadamente el 0,001 por ciento a aproximadamente el noventa por ciento de principio activo, preferentemente de aproximadamente el 0,005 por ciento a aproximadamente el 70 por ciento, lo más preferentemente de aproximadamente el 0,01 por ciento a aproximadamente el 30 por ciento.

Las formulaciones de la presente invención que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol que contienen tales vehículos como se conocen en la técnica por ser apropiados. Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de composiciones de la presente invención incluyen polvos, esprays, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. El compuesto activo puede mezclarse en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda requerirse.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usan en el presente documento, significan modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, e infusión.

Ejemplos de vehículos acuosos o no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersiones y por el uso de tensioactivos.

Estas composiciones pueden también contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, emulsionantes y dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto por procedimientos de esterilización, anteriormente, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede desearse incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Cuando los compuestos de la presente invención se administran como compuestos farmacéuticos a los seres humanos y animales, pueden administrarse solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0,001 al 90 % (más preferentemente 0,005 al 70 %, tal como 0,01 al 30 %) de principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos para los expertos en la técnica.

5 Pueden variarse los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención para obtener una cantidad de principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleada, o el éster, la sal o la amida del mismo, la vía de administración, el momento de administración, la velocidad de eliminación del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, afección, salud general e historia clínica previa del paciente que está tratándose, y factores similares muy conocidos en las técnicas médicas. Un médico o veterinario con experiencia en la técnica puede determinar fácilmente y recetar la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar las dosis de los compuestos de la invención empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta lograr el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será esa cantidad del compuesto que es la menor dosis eficaz para producir un efecto terapéutico. Tal dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferentemente administrada próxima al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado en intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente en formas de dosificación unitaria. Aunque es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmico sin aguja, tal como los dispositivos desvelados en las patentes de EE.UU. N.º 5.399.163, 5.383.851, 5.312.335, 5.064.413, 4.941.880, 4.790.824 o 4.596.556. Ejemplos de implantes y módulos muy conocidos útiles en la presente invención incluyen: patente de EE.UU. N.º 4.487.603, que desvela una bomba de microinfusión implantable para administrar medicación a una velocidad controlada; patente de EE.UU. N.º 4.486.194, que desvela un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; patente de EE.UU. N.º 4.447.233, que desvela una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una velocidad de infusión exacta; patente de EE.UU. N.º 4.447.224, que desvela un aparato de infusión implantable de flujo variable para administración continua de fármaco; patente de EE.UU. N.º 4.439.196, que describe un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimentos multicámara; y patente de EE.UU. N.º 4.475.196, que desvela un sistema de administración de fármaco osmótico. Los expertos en la técnica conocen muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención pueden formularse para garantizar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.522.811; 5.374.548 y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan selectivamente a células u órganos específicos, mejorando así la administración del fármaco dirigido (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Restos de direccionamiento a modo de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 5.416.016 a Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); tensioactivo receptor de la proteína A (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134), diferentes especies de las cuales pueden comprender las formulaciones de la invención, además de componentes de las moléculas inventadas; p120 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273. En una realización de la invención, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas; en una realización más preferida, los liposomas incluyen un resto de direccionamiento. En una realización más preferida, los compuestos terapéuticos en los liposomas se administran por inyección en bolo a un sitio próximo al tumor o la infección. La composición debe ser fluida hasta tal punto de que exista fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

La capacidad de un compuesto para inhibir cáncer puede evaluarse en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir, tal inhibición *in vitro* mediante ensayos conocidos por el médico experto. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor o mejorar de otra manera los síntomas en un sujeto. Un experto habitual en la técnica sería capaz de determinar tales cantidades

basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particulares seleccionadas.

La composición debe ser estéril y fluida hasta tal punto que la composición sea administrable por jeringa. Además de agua, el vehículo puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol y cloruro de sodio, en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Cuando el compuesto activo está adecuadamente protegido, como se ha descrito anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable.

#### IV. Usos y métodos de la invención

En una realización, los anticuerpos, moléculas biespecíficas y composiciones de la presente invención pueden usarse para tratar y/o prevenir (por ejemplo, inmunizar contra) una variedad de enfermedades y afecciones.

Una de las indicaciones de enfermedad primaria que puede tratarse es el cáncer. En particular, un anticuerpo anti-CD27 que induce o mejora una respuesta inmunitaria puede usarse en el tratamiento del cáncer. Tipos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, eritroleucemia monocítica mielomonocítica promielocítica de mieloblastos, leucemia crónica, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células del manto, linfoma del sistema nervioso central primario, linfoma de Burkitt y linfoma de linfocitos B de la zona marginal, linfoma policitemia vera, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de las cadenas pesadas, tumores sólidos, sarcomas y carcinomas, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de colon, carcinoma colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón no de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma esofágico, carcinoma de células basales, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro y sistema nervioso central (SNC), cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cánceres colorrectales, cáncer de tejido conjuntivo, cáncer del aparato digestivo, cáncer endometrial, cáncer de esófago, cáncer de ojo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, neoplasia intraepitelial, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (de células pequeñas, de células grandes), melanoma, neuroblastoma; cáncer de cavidad bucal (por ejemplo, labios, lengua, boca y faringe), cáncer de ovarios, cáncer pancreático, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer rectal; cáncer del aparato respiratorio, sarcoma, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer uterino y cáncer del aparato urinario. Los cánceres preferidos incluyen tumores que expresan CD27 seleccionados del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica, linfoma de células del manto, linfoma del sistema nervioso central primario, linfoma de Burkitt y linfoma de linfocitos B de la zona marginal.

Otras indicaciones de enfermedad para el uso de un anticuerpo anti-CD27 que induce o mejora una respuesta inmunitaria incluye enfermedades infecciosas bacterianas, fúngicas, virales y parasitarias. Otras indicaciones de enfermedad para el uso de un anticuerpo anti-CD27 que inhibe o reduce una respuesta inmunitaria incluye rechazo de injerto, alergia y enfermedades autoinmunitarias.

Enfermedades autoinmunitarias a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes de tipo 1, psoriasis, enfermedad de Crohn y otras enfermedades inflamatorias del intestino tales como colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico (SLE), encefalomielitis autoinmune, miastenia grave (MG), tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Goodpasture, pénfigo, enfermedad de Graves, anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica autoinmune, esclerodermia con anticuerpos anti-colágeno, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, polimiositis, anemia perniciosa, enfermedad de Addison idiopática, infertilidad asociada autoinmune, glomerulonefritis, glomerulonefritis crescéntica, glomerulonefritis proliferativa, penfigoide bulloso, síndrome de Sjogren, artritis psoriásica, resistencia a la insulina, diabetes mellitus autoinmune, hepatitis autoinmune, hemofilia autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS), hepatitis autoinmune, hemofilia autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune, uveorretinitis autoinmune, síndrome de Guillain-Barré, arteriosclerosis y enfermedad de Alzheimer. Trastornos alérgicos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, conjuntivitis alérgica, conjuntivitis

primaveral, queratoconjuntivitis primaveral y conjuntivitis papilar gigante; trastornos alérgicos nasales, que incluyen rinitis alérgica y sinusitis; trastornos alérgicos óticos, que incluyen picos de la trompa de Eustaquio; trastornos alérgicos de las vías respiratorias superiores e inferiores, que incluyen asma intrínseco y extrínseco; trastornos alérgicos de la piel, que incluyen dermatitis, eccema y urticaria; y trastornos alérgicos del tubo gastrointestinal.

En otro aspecto, un anticuerpo de la invención se administra en combinación con una vacuna, para mejorar la respuesta inmunitaria al antígeno de la vacuna, por ejemplo, un antígeno de tumor (para así mejorar la respuesta inmunitaria al tumor) o un antígeno de un patógeno de enfermedad infecciosa (para así mejorar la respuesta inmunitaria al patógeno de enfermedad infecciosa). Por consiguiente, en esta realización, un antígeno de vacuna puede comprender, por ejemplo, un antígeno o composición antigénica capaz de provocar una respuesta inmunitaria a un tumor o a un patógeno de enfermedad infecciosa tal como un virus, una bacteria, un parásito o un hongo. El antígeno o antígenos pueden ser, por ejemplo, péptidos/proteínas, polisacáridos y/o lípidos. El antígeno o antígenos derivan de tumores, tales como los diversos antígenos de tumor previamente desvelados en el presente documento. Alternativamente, el antígeno o antígenos pueden derivar de patógenos tales como virus, bacterias, parásitos y/u hongos, tales como los diversos antígenos de patógenos previamente desvelados en el presente documento. Ejemplos adicionales de antígenos de patógenos adecuados incluyen, pero no se limitan a, los siguientes:

Los antígenos virales o determinantes antigénicos pueden derivar de, por ejemplo:

Citomegalovirus (especialmente humano, tal como gB o derivados del mismo); virus Epstein Barr (tal como gp350); flavivirus (por ejemplo, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitida por garrapata, virus de la encefalitis japonesa); virus de la hepatitis tales como virus de la hepatitis B (por ejemplo, antígeno de superficie de la hepatitis B tal como los antígenos PreS1, PreS2 y S descritos en los documentos EP-A-414 374; EP-A- 0304 578, y EP-A-198474), virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C y virus de la hepatitis E; VIH-1, (tal como tat, nef, gp120 o gp160); virus del herpes humano, tales como gD o derivados de los mismos o proteína temprana inmediata tal como ICP27 de VHS1 o VHS2; virus del papiloma humano (por ejemplo, VPH6, 11, 16, 18); virus de la gripe (virus inactivado o vivo completo, virus dividido de la gripe, cultivado en huevos o células MDCK, o células Vero o virosomas enteros de la gripe (como se describe por Gluck, Vaccine, 1992,10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, tales como proteínas NP, NA, HA o M); virus del sarampión; virus de las paperas; virus paragripal; virus de la rabia; virus respiratorio sincitial (tal como proteínas F y G); rotavirus (que incluye virus vivos atenuados); virus de la viruela; virus de la varicela zóster (tal como gpl, II e IE63); y los virus VPH responsables del cáncer de cuello uterino (por ejemplo, las proteínas tempranas E6 o E7 en fusión con un vehículo de proteína D para formar fusiones de proteína D-E6 o E7 de VPH 16, o combinaciones de los mismos; o combinaciones de E6 o E7 con L2 (véase, por ejemplo, el documento WO 96/26277).

Los antígenos bacterianos o determinantes antigénicos pueden derivar, por ejemplo, de: *Bacillus* spp., que incluye *B. anthracis* (por ejemplo, toxina botulínica); *Bordetella* spp, que incluye *B. pertussis* (por ejemplo, pertactina, toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbriae); *Borrelia* spp., que incluye *B. burgdorferi* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo, OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Campylobacter* spp, que incluye *C. jejuni* (por ejemplo, toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; *Chlamydia* spp., que incluye *C. trachomatis* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo, MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. psittaci*; *Clostridium* spp., que incluye *C. tetani* (tal como toxina del tétanos), *C. botulinum* (por ejemplo, toxina botulínica), *C. difficile* (por ejemplo, toxinas de clostridio A o B); *Corynebacterium* spp., que incluye *C. diphtheriae* (por ejemplo, toxina de la difteria); *Ehrlichia* spp., que incluye *E. equi* y el agente de la ehrlichiosis granulocítica humana; *Rickettsia* spp, que incluye *R. rickettsii*; *Enterococcus* spp., que incluye *E. faecalis*, *E. faecium*; *Escherichia* spp, que incluye *E. coli* enterotóxica (por ejemplo, factores de colonización, toxina termolábil o derivados de la misma, o toxina termoestable), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena (por ejemplo, toxina tipo toxina shiga); *Haemophilus* spp., que incluye *H. influenzae* tipo B (por ejemplo, PRP), *H. influenzae* no tipificable, por ejemplo, OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbrina y péptidos derivados de fimbrina (véase, por ejemplo, el documento US 5.843.464); *Helicobacter* spp, que incluye *H. pylori* (por ejemplo, ureasa, catalasa, toxina vacuolante); *Pseudomonas* spp, que incluye *P. aeruginosa*; *Legionella* spp, que incluye *L. pneumophila*; *Leptospira* spp., que incluye *L. interrogans*; *Listeria* spp., que incluye *L. monocytogenes*; *Moraxella* spp, que incluye *M. catarrhalis*, también denominado *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo, adhesinas e invasinas de alto y bajo peso molecular); *Moraxella Catarrhalis* (que incluye vesículas de membrana externa de la misma, y OMP106 (véase por ejemplo, el documento WO97/41731)); *Mycobacterium* spp., que incluye *M. tuberculosis* (por ejemplo, ESAT6, antígeno 85A, -B o -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Neisseria* spp, que incluye *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, Pi1C, adhesinas); *Neisseria meningitidis* B (que incluye vesículas de membrana externa de la misma, y NspA (véase, por ejemplo, el documento WO96/29412)); *Salmonella* spp, que incluye *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Shigella* spp, que incluye *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Staphylococcus* spp., que

incluye *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Streptococcus* spp, que incluye *S. pneumonie* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina) y el antígeno de proteína Pneumolisina (Biochem Biophys Acta, 1989,67,1007; Rubins et al., Microbial Pathogenesis, 25,337-342), y derivados purificados mutantes de los mismos (véanse, por ejemplo, los documentos WO 90/06951; WO 99/03884);  
 5 *Treponema* spp., que incluye *T. pallidum* (por ejemplo, las proteínas de la membrana externa), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; *Vibrio* spp, que incluye *V. cholera* (por ejemplo, toxina del cólera); y *Yersinia* spp, que incluye *Y. enterocolitica* (por ejemplo, una proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*.

Los antígenos parasíticos/fúngicos o determinantes antigénicos pueden derivar, por ejemplo, de: *Babesia* spp., que incluye *B. microti*; *Candida* spp., que incluye *C. albicans*; *Cryptococcus* spp., que incluye *C. neoformans*; *Entamoeba* spp., que incluye *E. histolitica*; *Giardia* spp., que incluye *G. lamblia*; *Leshmania* spp., que incluye *L. major*; *Plasmodium*, faciparum (MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en *Plasmodium* spp.); *Pneumocystis* spp., que incluye *P. carinii*; *Schistosoma* spp., que incluye *S. mansoni*; *Trichomonas* spp., que incluye *T. vaginalis*; *Toxoplasma* spp., que incluye *T. gondii* (por ejemplo, SAG2, SAG3, Tg34); *Trypanosoma* spp., que incluye *T. cruzi*.

Se apreciará que según este aspecto de la presente invención, los antígenos y determinantes antigénicos pueden usarse de muchas formas diferentes. Por ejemplo, los antígenos o determinantes antigénicos pueden estar presentes como proteínas o péptidos aislados (por ejemplo, en las llamadas "vacunas de subunidad") o, por ejemplo, como antígenos o determinantes antigénicos asociados a células o asociados a virus (por ejemplo, en tanto cepas de patógenos vivos como muertos). Los patógenos vivos se atenuarán preferentemente de manera conocida. Alternativamente, los antígenos o determinantes antigénicos pueden generarse *in situ* en el sujeto usando un polinucleótido que codifica un antígeno o determinante antigénico (como en la llamada "vacunación de ADN"),  
 20 aunque se apreciará que los polinucleótidos que pueden usarse con este enfoque no están limitados al ADN, y pueden también incluir ARN y polinucleótidos modificados como se ha tratado anteriormente.

En una realización, un antígeno de vacuna también puede dirigirse, por ejemplo, a tipos de células particulares o a tejidos particulares. Por ejemplo, el antígeno de vacuna puede dirigirse a células presentadoras de antígenos (APC),  
 30 por ejemplo, usando agentes tales como anticuerpos dirigidos a receptores de la superficie de APC tales como DEC-205, por ejemplo, como se trata en el documento WO 2009/061996 (Celldex Therapeutics, Inc), o el receptor de manosa (CD206), por ejemplo, como se trata en el documento WO 03040169 (Medarex, Inc.).

Para su uso en terapia, los anticuerpos de la invención pueden administrarse a un sujeto directamente (es decir, *in vivo*), tanto solos como con otras terapias tales como un agente inmunoestimulante, una vacuna, quimioterapia o radioterapia. En todos los casos, los anticuerpos, biespecíficos, composiciones y agentes inmunoestimulantes y otras terapias se administran en una cantidad eficaz para ejercer su efecto terapéutico deseado. El término "cantidad eficaz" se refiere a aquella cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz podría ser aquella cantidad necesaria para eliminar un tumor, cáncer o infección bacteriana, viral o fúngica. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o afección que está tratándose, el anticuerpo particular que se administra, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o afección. Un experto habitual en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de una molécula particular sin necesidad de excesiva experimentación.

Vías de administración preferidas para vacunas incluyen, por ejemplo, inyección (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intratecal). La inyección puede ser en un bolo o una infusión continua. Otras vías de administración incluyen administración por vía oral.

Los anticuerpos y moléculas biespecíficas de la invención también pueden coadministrarse con adyuvantes y otros agentes terapéuticos. Se apreciará que el término "coadministrado" como se usa en el presente documento incluye cualquiera o todas de administración simultánea, separada o secuencial de los anticuerpos y conjugados de la presente invención con adyuvantes y otros agentes que incluyen la administración como parte de una pauta de dosificación. Los anticuerpos normalmente se formulan en un vehículo solo o en combinación con tales agentes. Ejemplos de tales vehículos incluyen soluciones, disolventes, medios de dispersión, agentes retardantes, emulsiones y similares. El uso de tales medios para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Cualquier otro vehículo convencional adecuado para su uso con las moléculas entra dentro del alcance de la presente invención.

Agentes adecuados para la co-administración con los anticuerpos, conjugados, biespecíficos y composiciones incluyen otros anticuerpos, citotoxinas y/o fármacos, además de adyuvantes, agentes inmunoestimulantes y/o agentes inmunosupresores. En una realización, el agente es un agente quimioterapéutico. Los anticuerpos, biespecíficos y composiciones pueden administrarse en combinación con radiación.

Agentes quimioterapéuticos adecuados para la coadministración con los anticuerpos y conjugados de la presente invención en el tratamiento de tumores incluyen, por ejemplo: taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina,

dihidroxiantracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Agentes adicionales incluyen, por ejemplo, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracildecabazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina) y temozolomida.

Agentes que eliminan o inhiben actividades inmunosupresoras, por ejemplo, por células inmunitarias (por ejemplo, linfocitos T reguladores, linfocitos NKT, macrófagos, células supresoras derivadas de mieloides, células dendríticas inmaduras o supresoras) o factores supresores producidos por el tumor o células huésped en el microambiente local del tumor (por ejemplo, TGFbeta, indolamina 2,3-dioxigenasa - IDO), también pueden administrarse con los anticuerpos y conjugados de la presente invención. Tales agentes incluyen anticuerpos y fármacos de molécula pequeña tales como inhibidores de IDO tales como 1-metilriptófano o derivados.

Agentes adecuados para la coadministración con los anticuerpos y biespecíficos de la presente invención para el tratamiento de tales trastornos inmunitarios incluyen, por ejemplo, agentes inmunosupresores tales como rapamicina, ciclosporina y FK506; agentes anti-TNFa tales como etanercept, adalimumab e infliximab; y esteroides. Ejemplos de esteroides específicos naturales y sintéticos incluyen, por ejemplo: aldosterona, beclometasona, betametasona, budesonida, cloprednol, cortisona, cortivazol, desoxicortona, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflucortolona, fluclorolona, flumetasona, flunisolida, fluocinolona, fluocinonida, flucortin-butilo, fluorocortisona, fluorocortolona, fluorometolona, flurandrenolona, fluticasona, halcinonida, hidrocortisona, icometasona, meprednisona, metilprednisolona, parametasona, prednisolona, prednisona, tixocortol y triamcinolona.

Agentes adecuados para la coadministración con los anticuerpos y biespecíficos de la presente invención para la inducción o el mejoramiento de una respuesta inmunitaria incluyen, por ejemplo, adyuvantes y/o agentes inmunoestimulantes, ejemplos no limitantes de los cuales se han desvelado anteriormente en este documento. Un agente inmunoestimulante preferido es un agonista de TLR3, tal como Poly IC.

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como adicionalmente restrictivos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### **Generación de anticuerpos monoclonales humanos específicos para CD27**

Se generaron anticuerpos monoclonales anti-CD27 humanos inmunizando la cepa HC2/KCo7 de ratones transgénicos HuMAb® ("HuMAb" es una marca registrada de Medarex, Inc., Princeton, Nueva Jersey) con un antígeno CD27 humana soluble. Los ratones HC2/KCo7 HuMAb se generaron como se describe en las patentes de EE.UU. N.º 5.770.429 y 5.545.806.

Antígeno e inmunización: El antígeno era una proteína de fusión soluble que comprende un dominio extracelular de CD27 fusionado con un dominio Fc de anticuerpo (proteína quimérica CD27-Fc humana recombinante (R&D Systems). El antígeno se mezcló con adyuvante completo de Freund (Sigma) para la primera inmunización. A partir de aquí, el antígeno se mezcló con adyuvante incompleto de Freund (Sigma). Se inmunizaron ratones adicionales con la proteína CD27 soluble en RIBI MPL más sistema adyuvante de TDM (Sigma). 5-25 microgramos de antígeno CD27 soluble recombinante en PBS o  $5 \times 10^6$  células CHO transfectadas para la expresión superficial de CD27 humana en PBS se mezclaron 1:1 con el adyuvante. Los ratones se inyectaron con 100 microlitros del antígeno preparado en la cavidad peritoneal cada 14 días. A los animales que desarrollaron títulos anti-CD27 se les administró una inyección iv de 10 microgramos de antígeno CD27 soluble recombinante tres a cuatro días antes de la fusión. Se recogieron los bazo de ratón y los esplenocitos aislados se usaron para la preparación de hibridomas.

Preparación de hibridomas: Se usó la línea celular de mieloma de murino P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580) para las fusiones. Se usó RPMI 1640 (Invitrogen) que contenía 10 % de FBS para cultivar las células de mieloma. Se añadieron complementos de medio adicionales al medio de crecimiento de hibridoma, que incluyeron: 3 % de factor de clonación de hibridomas Origen (Igen), 10 % de FBS (Sigma), L-glutamina (Gibco), 0,1 % de gentamicina (Gibco), 2-mercaptoetanol (Gibco), medios HAT (Sigma; hipoxantina  $1,0 \times 10^{-4}$  M, aminopterina  $4,0 \times 10^{-7}$  M, timidina  $1,6 \times 10^{-5}$  M), o HT (Sigma; hipoxantina  $1,0 \times 10^{-4}$  M, timidina  $1,6 \times 10^{-5}$  M).

Las células de bazo se mezclaron con células de mieloma P3x63Ag8.653 en una relación 6:1 y se sedimentaron por centrifugación. Se añadió gota a gota polietilenglicol mezclando cuidadosamente para facilitar la fusión. Se dejó que los hibridomas crecieran durante una a dos semanas hasta que se establecieron colonias visibles. Se recogió el

sobrenadante y se usó para el cribado inicial para IgG humana mediante ELISA usando una captura específica de cadena kappa humana y una detección específica de Fc humano. Entonces, los sobrenadantes positivos para IgG se ensayaron para la especificidad de CD27 mediante citometría de flujo o usando un ELISA para detectar anti-CD27.

Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos específicos (mAb humanos; IgG) se subclonaron y expandieron. Los mAb humanos producidos se purificaron luego por cromatografía en columna de proteína A según condiciones normales que condujeron al aislamiento de varios anticuerpos de interés particular, que se denominaron 4B7-1B3 (también denominado en el presente documento 4B7), 3H12-1C8 (también denominado en el presente documento 3H12), 1F5-1H5 (también denominado en el presente documento 1F5), 2C2-1A10 (también denominado en el presente documento 2C2), 2G9-1D11 (también denominado en el presente documento 2G9), 1H8-B4 (también denominado en la presente 1H8), 3H12-1E12 (también denominado en la presente 3H12), 3G1-1A11 (también denominado en el presente documento 3G1) (1B10), 4A2-B11 (también denominado en el presente documento 4A2), 3A10-G10 (también denominado en el presente documento 3A10), 2G11-B5 (también denominado en el presente documento 2G11), 4H11-G11 (también denominado en el presente documento 4H11), 2H3-E8 (también denominado en el presente documento 2H3), 4A7-B3 (también denominado en la presente 4A7), 3H8-1B11 (también denominado en la presente 3H8) y 1G5-1B9 (también denominado en el presente documento 1G5).

También se cribaron hibridomas para determinar la reactividad cruzada con CD27 de macaco rhesus y todos fueron positivos para unión.

## **Ejemplo 2**

### **Determinación de afinidad y constantes de velocidad de mAb humanos por resonancia de plasmones superficiales (SPR)**

Se examinaron la afinidad de unión y la cinética de unión de diversos anticuerpos anti-CD27 humanos del Ejemplo 1 por análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) Biacore™ usando un instrumento Biacore™ 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Suecia) según las pautas del fabricante.

Se unió covalentemente la proteína quimérica CD27/TNFRSF7/Fc humana recombinante purificada (R&D Systems, catálogo N.º 382-CD) a un chip sensor Biacore™ CM5 (dextrano carboximetilado covalentemente unido a una superficie de oro; producto de Biacore N.º BR-1000-14) usando química de acoplamiento de aminas estándar con un kit de acoplamiento de aminas proporcionado por Biacore según las pautas del fabricante (producto de Biacore N.º BR-1000-50, que comprende reactivos de acoplamiento N-hidroxisuccinimida (NHS) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC)). Se inmovilizaron niveles bajos de ligando para limitar cualquier efecto del transporte de masa de analito sobre los parámetros cinéticos, de forma que la  $R_{\text{máx}}$  observada estuviera en el orden de 100-400 UR.

La unión se midió haciendo fluir los anticuerpos sobre el chip sensor en tampón HBS-EP (tampón HBS-EP, producto de Biacore N.º BR-1001-88: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES) 0,01 M, cloruro sódico 0,15 M, ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) 3 mM, tensoactivo P20 0,005 %), a concentraciones que oscilaban de 1,56 a 50 nM y a un caudal de 30  $\mu\text{l}/\text{minuto}$  durante 180 segundos. Se siguió la cinética de asociación y disociación antígeno-anticuerpo durante 480 segundos o 1200 segundos para anticuerpos con velocidades de disociación más lentas.

Se realizaron controles correspondientes en cada caso usando una celda de flujo de blanco sin proteína inmovilizada para restar el "nivel de fondo". Se usaron inyecciones secuenciales de HCl 10 mM durante 10 segundos a 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ , seguidas de glicina 10 mM a pH 2.0 durante 30 segundos a 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  como las condiciones de regeneración a lo largo del estudio.

Se usó el software BIAevaluation de Biacore versión 3.2 (Biacore AB, Uppsala, Suecia) en cada caso para derivar parámetros cinéticos de la serie de concentraciones de analito diluido en tampón de electroforesis HBS-EP. Las curvas de asociación y disociación se ajustaron a un modelo de unión de Langmuir 1:1 usando el software BIAevaluation Biacore™ (Biacore AB) según las pautas del fabricante.

Los parámetros cinéticos y de afinidad (con referencia restada) como se determinan se muestran en la Figura 1.

Para cada anticuerpo, las figuras mostradas son la media de dos series de experimentos separadas, usando celdas de flujo preparadas por separado en cada caso (donde  $k_a$  = constante de velocidad de asociación,  $k_d$  = constante de velocidad de disociación,  $K_D$  = constante de equilibrio de disociación (medida de afinidad),  $K_A$  = constante de equilibrio de asociación,  $R_{\text{máx}}$  = señal máxima de respuesta de SPR).

**Ejemplo 3****Ensayo de ELISA para determinar características de unión a mAb humano en CD27**

5 Se recubrieron placas de microtitulación con CD27 humana o de macaco soluble o recombinante en PBS, y luego se bloquearon con 5 % de albúmina de suero bovino en PBS. Se añadieron mAb humanos purificados con proteína A y un control de isotipo a concentraciones de saturación y se incubaron a 37 °C. Las placas se lavaron con PBS/Tween y luego se incubaron con un reactivo policlonal específico de Fc anti-IgG humana de cabra conjugado con fosfatasa alcalina a 37 °C. Después de lavar, las placas se desarrollaron con sustrato pNPP (1 mg/ml), y se analizaron a DO 10 405-650 usando un lector de placas de microtitulación. Curvas de unión representativas se muestran en la Figura 2. Los resultados también se usaron para estimar la concentración de saturación al 50 % (valor C en la curva de ajuste de 4 parámetros) como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

15 Para establecer que los macacos cinomolgos son un modelo importante para probar los mAb anti-CD27, se capturaron diversas concentraciones de CD27 de macaco o de CD27 humana purificadas en placas de ELISA con anticuerpo anti-Flag, seguido de incubación con mAb anti-CD27 humana. Se usaron un anticuerpo Fc-HRP anti-IgG humana de cabra y sustrato Super Blue TMB para la detección. Los resultados se muestran en la Tabla 1, que indica unión similar a CD27 de macaco y humano. Curvas de unión representativas para el anticuerpo 1F5 también se muestran en la Figura 3.

20

**Tabla 1**

Caracterización de mAb anti-CD27 seleccionados			
mAb	Unión a 150 % a CD27 humana (M)**	Unión al 50 % a CD27 humana (µg/ml)**	Unión al 50 % a CD27 de mono (µg/ml)**
1G5	4,9E-10	0,074	0,065
1H8	4,3E-10	0,064	0,105
3H12	5,7E-10	0,085	0,123
3H8	4,6E-10	0,069	0,065
2G9	4,3E-10	0,064	0,069
1F5	3,9E-10	0,059	0,12
3A10	6,3E-10	0,094	Sin unión
2C2	3,0E-10	0,045	0,034
** estimado uniendo a placas cubiertas con CD27 en un formato de ELISA			

25 En otro experimento, para establecer una distribución similar de la unión de 1F5 a células de sangre periférica, se aislaron CMSP de sangre completa de 3 humanos y 3 macacos cinomolgos. Las células se tiñeron con mAb 1F5 junto con marcadores para delinear las principales poblaciones de linfocitos T y linfocitos B que expresaban CD27. La siguiente tabla (Tabla 2) resume la media ± error estándar de resultados para células humanas y de macaco con respecto al porcentaje de células que expresan CD27 y la intensidad de expresión (MFI). Estos datos establecen una distribución similar de unión de 1F5 a células de sangre periférica de ser humano y mono.

30

**Tabla 2**

Análisis	Linfocitos T CD4+		Linfocitos T CD8+		Linfocitos B (CD20+)		Linfocitos NK	
	humano	mono	humano	mono	humano	mono	humano	mono
% de CD27 <sup>D</sup>	84±5	81±1	70 ± 12	90 ± 1	37±4	15±1	11±4	88 ± 6
MFI <sup>C</sup>	1517± 123	416± 14	1415± 153	519±11	893± 101	491± 113	667± 28	1050± 42

**Ejemplo 4****4A: Bloqueo de la unión a sCD70 por ELISA**

35

Se midió el efecto de los mAb humanos del Ejemplo 1 sobre la unión de proteína CD70 soluble (sCD70) a CD27 por ELISA. Se recubrió una placa de microtitulación con 1 µg/ml de quimera CD27/Fc recombinante humana soluble de R&D Systems a 1 µg/ml, luego se bloqueó con 5 % de PBA. Los anticuerpos anti-CD27 ([final] = 25 µg/ml) se mezclaron previamente con CD70 recombinante humano soluble-biotina de US Biologicals ([final] = 0,5 µg/ml) y se añadieron a la placa. Se detectó rCD70 capturado con CD27 con estreptavidina-HRP y sustrato Super Blue TMB. 40 Los resultados (mostrados como % de bloqueo) se muestran en la Figura 4 con controles tal como se indica. Estos resultados muestran que varios de los anticuerpos (que incluyen 1F5, 1H8, 3H12 y 1A4) tuvieron la propiedad de bloquear o al menos inhibir significativamente la unión de sCD70.

**4B: mAb CD27 se une a CD27 en líneas celulares linfoblastoides humanas y bloquea la unión al ligando (CD70)**

45 Se analizó la unión del mAb anti-CD27 humana 1F5 a líneas celulares linfoblastoides humanas, y el bloqueo de la unión de sCD70, por citometría de flujo usando un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCanto II. Los resultados

se muestran en la Figura 5, y muestran que 1F5 se une eficazmente a una variedad de líneas celulares e inhibe competitivamente la unión de sCD70.

### **Ejemplo 5**

#### **Unión de mAb humanos a células que expresan CD27 humana**

Se investigó la capacidad de los mAb anti-CD27 humana para unirse a CD27 en células que expresan CD27 humana en su superficie se investigó por citometría de flujo del siguiente modo.

Se probaron anticuerpos para unirse a líneas celulares humanas que expresan D27 humano en su superficie. Se incubaron mAb humanos purificados con proteína A 2C2, 3H8 y 1F5 con células Jurkat, Raji, Ramos y Daudi que expresan CD27 humana, además de células de control a 4 °C. Todos los anticuerpos se usaron a concentraciones de saturación. Después de 1 hora, las células se lavaron con PBS que contenía 0,1 % de BSA y 0,05 % de NaN<sub>3</sub> (PBA) y los anticuerpos unidos se detectaron incubando las células con una sonda específica de Fc anti-IgG humana de cabra marcada con PE, a 4 °C. La sonda en exceso se lavó de las células con PBA y la fluorescencia asociada a células se determinó por análisis usando un instrumento LSR™ (BD Biosciences, NJ, EE.UU.) según las pautas del fabricante.

Como se muestra en las Figuras 6 y 7, los mAb humanos demostraron unión de alto nivel a células que expresan CD27 humana. Estos datos demostraron que estos anticuerpos se unen eficazmente y específicamente a CD27 humana expresada en células vivas en comparación con las células de control.

### **Ejemplo 6**

#### **Bloqueo cruzado/competencia de mAb humanos determinado por ELISA**

Se recubrió una placa de microtitulación con una proteína de fusión quimérica CD27-Fc humana recombinante, luego se bloqueó con 5 % de BSA en PBS. Los mAb humanos sin conjugar (20 µg/ml) se mezclaron con anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano picante (0,5 µg/ml), luego se añadieron a la placa y se incubaron a 37 °C. Las placas se lavaron con PBS/Tween y se desarrollaron con sustrato TMB y se analizaron a DO 450 usando un lector de placas de microtitulación. Los resultados, mostrados en las Figuras 8 a 10, indican que un primer conjunto de los mAb humanos (que comprenden los mAb 1F5, 1H8 y 3H12) compiten de forma cruzada unos con los otros (véase la Figura 8), que un conjunto adicional de los mAb humanos (que comprenden los mAb 2C2, 3H8, 1G5 y 2G9) también compiten de forma cruzada unos con los otros (véase la Figura 9) y que el mAb humano 3A10 se une a un epítipo único pero puede unirse en un sitio distinto pero posiblemente cerca de los sitios de unión de los mAb 1F5, 1H8 y 3H12 debido a que estos anticuerpos eran capaces de bloquear de forma cruzada parcialmente la unión de 3A10 a CD27 (véase la Figura 10).

### **Ejemplo 7**

#### **Citotoxicidad celular dependiente del complemento (CDCC o CDC)**

Se cultivaron células diana (células Raji de linfoma) (en medio AIM-V) durante 1-2 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> en presencia de anticuerpos anti-CD27 y complemento de conejo (dilución final de 1:15) en un volumen final de 150 µl. También se incluyeron controles apropiados con una señal de filtración (solamente diana) y señal MAX (dianas con detergente Lyso™ al 12 % para una concentración final de 4 %). Las células se ajustaron a 1 x 10<sup>6</sup>/ml y se añadieron 50 µl a cada pocillo (para dar 50.000 células/pocillo). Los pocillos se resuspendieron luego y se transfirieron 100 µl de la suspensión celular a una placa blanca opaca. A cada uno de estos pocillos se añadió 100 µl del reactivo Promega CellTiter Glo y la placa se mezcló durante 2 minutos a temperatura ambiente. La placa se dejó incubar durante 10 minutos para estabilizar la señal luminiscente. La luminiscencia se registró en un lector de placas Perkin Elmer Victor X4. La citotoxicidad se determinó con la siguiente fórmula:  $(100 - ((\text{muestra} - \text{MÁX}) / (\text{filtración} - \text{MÁX}))) \times 100$ . Los resultados (mostrados como % de lisis) se muestran en la Figura 11 a partir de la cual puede verse que varios anticuerpos anti-CD27 presentaron actividad de CDCC significativa.

En un experimento adicional, se lavaron células diana (células Ramos) y se cargaron con Calcein AM (Molecular Probes). Las células cargadas se lavaron luego otra vez y se resuspendieron a 1x10<sup>6</sup>/ml en medio de cultivo (RPMI + 10 % de FBS). Las células diana se cultivaron durante 2 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>, en presencia de anticuerpos anti-CD27 y complemento de conejo (dilución final de 1:15) en un volumen final de 150 µl. También se incluyeron controles apropiados con una señal de filtración (solamente diana) y señal MAX (dianas con Triton X-100 al 20 % para una concentración final de 2 %). Tras la incubación, se transfirieron 75 µl de sobrenadante de los pocillos a una placa negra opaca. La fluorescencia (Ex 485; Em 535) se registró en un lector de placas Perkin Elmer Victor X4. La citotoxicidad específica se determinó con la siguiente fórmula:  $(\text{lisis experimental} - \text{espontánea}) / (\text{lisis máxima} - \text{lisis espontánea}) \times 100$ . Los resultados, mostrados en la Figura 12, indican que el mAb anti-CD27 (1F5) mostró una actividad de CDC de al menos el 10 % en células Ramos a una concentración de anticuerpo de 3 µg/ml.

**Ejemplo 8****Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC)**

5 Se lavaron células diana (células Raji de linfoma) y cargaron con reactivo BATDA (Perkin Elmer). Las células cargadas se lavaron luego otra vez y se resuspendieron a  $2 \times 10^5$ /ml en medio de cultivo (RPMI + 10 % de FBS). Se prepararon células efectoras y se ajustaron a concentraciones apropiadas en medio de cultivo dando las relaciones de efectoras:diana deseadas (100:1 - 50:1). En una placa de fondo redondo, se añadieron células diana, células efectoras y anticuerpo en un volumen final de 150 ul. Se usaron controles apropiados, que incluyen una señal de filtración (solamente dianas), una señal de lisis espontánea (dianas + efectoras) y una señal de lisis máxima (dianas + detergente Lysol™ al 12 % para una concentración final de 4 %). Las células se sedimentaron en la placa y se incubaron durante 2 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Tras la incubación, se transfirieron 20 ul de sobrenadante de los pocillos a una placa blanca opaca. A cada uno de estos pocillos se añadió 200 ul de solución de europio (Perkin Elmer) y la placa se mezcló durante 15 minutos. La fluorescencia resuelta en el tiempo se registró en un lector de placas Perkin Elmer Victor X4. La citotoxicidad específica se determinó usando la siguiente fórmula: (lisis experimental - espontánea)/(lisis máxima - lisis espontánea) x 100. Los resultados (mostrados como % de lisis) se muestran en la Figura 13 a partir de la cual puede verse que varios anticuerpos anti-CD27 presentaron actividad de ADCC significativa.

20 En un experimento adicional, se lavaron células diana (células Daudi y Ramos de linfoma) y se cargaron con Calcein AM (Molecular Probes). Las células cargadas se lavaron luego otra vez y se resuspendieron a  $1 \times 10^5$ /ml en medio de cultivo (RPMI + 10 % de FBS). Se prepararon células efectoras y se ajustaron a concentraciones apropiadas en medio de cultivo dando relaciones de efectoras:diana deseadas (75:1). En una placa de fondo redondo, se añadieron células diana, células efectoras y anticuerpo en un volumen final de 150 ul. Se usaron controles apropiados, que incluyen una señal de filtración (solamente dianas), una señal de lisis espontánea (dianas + efectoras) y una señal de lisis máxima (dianas + Triton X-100 al 20 % para una concentración final de 2 %). Las células se sedimentaron en la placa y se incubaron durante 4 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Tras la incubación, se transfirieron 75 ul de sobrenadante de los pocillos a una placa negra opaca. La fluorescencia (Ex 485; Em 535) se registró en un lector de placas Perkin Elmer Victor X4. La citotoxicidad específica se determinó usando la siguiente fórmula: (lisis experimental - espontánea)/(lisis máxima - lisis espontánea) x 100. Los resultados, mostrados en la Figura 14, indican que el mAb anti-CD27 (1F5) mostró una actividad de ADCC de al menos el 10 % (medida como citotoxicidad específica) en células Daudi y Ramos a una concentración de anticuerpo de 3 µg/ml y una relación de células efectoras:diana de 75:1.

**Ejemplo 9****Secuenciamiento de anticuerpos**

40 Como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1, los mAb humanos de hibridomas que producen IgG de mAb humanos específicos se purificaron por cromatografía en columna de proteína A que condujo al aislamiento de un panel de anticuerpos (mAb humanos) de particular interés. Se identificaron las regiones codificantes V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los mAb humanos 4B7, 3H12, 1F5, 2C2, 2G9, 1H8, 3H12, 3G1 (1B10) 4A2, 3A10, 2G11, 4H11, 2H3, 4A7, 3H8 y 1G5 usando ARN de los hibridomas correspondientes. El ARN se transcribió de forma inversa a ADNc, las regiones codificantes V se amplificaron por PCR y se secuenció el producto de PCR. Lo siguiente son las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de los mAb humanos (en el caso de las secuencias de aminoácidos, las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) están subrayadas).

**3H8 VH (VH 3-7; D7-27; JH2)**

50 Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 5)

```
atggagttggggctgagctgggtttcctgtgtctattttagaaggtgtccagtgtaggtgcagctggtggagtctggggaggcttg
gtccagcctgggggtccctgagactctctgtgcagcctctggattcacttttagtagttattggatggcctgggtccgccaggctcca
gggaaaaggctggagtggctgggcaatataaagcaagatggaagtgagaataactatgtggactctgtgaagggccgattcaccatc
tccagagacaacccaagaactcactgtatctacaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgtgagggaa
ctggggatggactgtactctgactctggggccctggcaccctggcactgtctctca
```

Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 6) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

55 MELGLSWVFLVAILEGVOCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMAWVR  
QAPGKGLEWLGNIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVY  
YCVRELGM DWYFDLWGRGLTVSS

Secuencia de aminoácidos "madura" de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 7) excluyendo el péptido señal:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMAWVRQAPGKGLEWLGNIKQDG  
SEKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRELGM DWYFDLW  
 RGLTLTVSS

V<sub>H</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 8): GFTFSSYW  
 V<sub>H</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 9): IKQDGSEK  
 V<sub>H</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 10): VRELGM DWYFDL

**3H8 VK #2 (VK 3-11; JK1)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 11)

Atggaagccccagctcagcttctctctctctgctactctggctcccagataccaccggagaaattgtgtgacacagtctccagccac  
 cctgtcttctcaggggaaagagccaccctctctgagggccagtcagagtggtgacagctacttagcctggtaccaacagaaac  
 ctggccaggctcccaggctctctctctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagccaggtcagtggtggtctggga  
 cagacttctctcaccatcagcaacctagagcctgaagatttgcagtttactgtcagcagcgtagcaactggcctccgacgttcg  
 gccaaagggaccaaggtggaatcaaa

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 12) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDSYLAWYQQ  
 KPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQRSNWPP  
TFGQGTKVEIK

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 13) excluyendo el péptido señal:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVDSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGI  
 PARFSGSGSGTDFTLTISNLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

V<sub>L</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 14): QSVDSY

V<sub>L</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 15): DAS

V<sub>L</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 16): QQRSNWPPT

**3H8 VK #3 (VK 3-11; JK1)**

También se encontró que una cadena ligera adicional era activa del siguiente modo (aunque solo se usó la cadena ligera anterior (3H8-1B11 VK #2) en los ejemplos anteriores):

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 17)

Atggaagccccagctcagcttctctctctctgctactctggctcccagataccaccggagaaattgtgtgacacagtctccagccac  
 cctgtcttctcaggggaaagagccaccctctctgagggccagtcagagtggtgacagctacttagcctggtaccaacagaaac  
 ctggccaggctcccaggctctctctctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagacaggtcagtggtggtctggga  
 cagacttctctcaccatcagcagactggagcctgaagatttgcagtggttactgtcagcagcgtagcaactggcctccgacgttcg  
 gccaaagggaccaaggtggaatcaaa

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 18) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK  
 PGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTF  
GQGTKVEIK

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 19) excluyendo el péptido señal:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIP  
 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQGTKVEIK

V<sub>L</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 20): QSVSSY

V<sub>L</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 21): DAS

V<sub>L</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 22): QQRSNWPPT

**2C2 VH (VH 3-33; D1-7; JH4)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 23)

Atggagtttgggctgagctgggtttcctcgttctctttaaagaggtgtccagtgtaggtgcaactggtggagctctggggaggcgtg  
gtccagcctgggaggtcctgcgactctcctgtgcagcgtctggattcaccctcagtagctatgacatacacctgggtccgccaggctcc  
aggcaaggggctggagtggtggcagttatggatgatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatc  
tccagagacaattccacgaactcgtgttctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattattgtgtgggaggaac  
tgctgacctgaacactgggaccaggaaccctggtcaccgtctcctca

Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 24) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

*MEFGLSWVFLVALLRQVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDIHWVR*  
*QAPGKGLEWVAVIWNDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSTNSLFLQMNSLRAEDTAVY*  
*YCVGGTADLEHWDQGLTVTVSS*

Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 25) excluyendo el péptido señal:

*QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDIHWVRQAPGKGLEWVAVIWNDGS*  
*NKYYADSVKGRFTISRDNSTNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCVGGTADLEHWDQGL*  
*TVTVSS*

V<sub>H</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 26): GFTFSSYD  
V<sub>H</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 27): IWNDGSNK  
V<sub>H</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 28): VGGTADLEHWDQ

**2C2 VK (VK 1D-16; JK4)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 29)

Atgagggtcctcgtcagctcctggggtcctcgtcgtctgtttccaggtgccagatgtgacatccagatgaccagctcctcatcctc  
actgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcggggcagtcagggtattagcagctggtagcctggatcagcaga  
cagagaaagcccctaagtccctgatctatgctgcatccagttgcaaatgggggtccatcaaggtcagcggcagtgatctgggac  
agatttcactcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgaacttactgccaacagtataatgtfaccctctcactttcggcg  
gagggaccaaggtggagatcaaa

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 30) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

*MRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQ*  
*KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLT*  
*FGGGTKVEIK*

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 31) excluyendo el péptido señal:

*DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV*  
*PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLT*  
*FGGGTKVEIK*

V<sub>L</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 32): QGISSW  
V<sub>L</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 33): AAS  
V<sub>L</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 34): QQYNSYPLT

**1F5 VH (VH 3-33; D7-27; JH4)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 35)

Atggagtttgggctgagctgggtttcctcgttctctttaaagaggtgtccagtgtaggtgcagctggtggagctctggggaggcgtg  
ggtccagcctgggaggtcctgagactctcctgtgcagcgtctggattcaccctcagtagttatgacatgactgggtccgccaggctc  
caggcaaggggctggagtggtggcagttatggatgatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaagggccgattcaccat  
ctccagagacaattccaagaacacgctgtatctcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggt  
agftgtaactgggtttcttgactactggggccaggaaccctggtcaccgtctcctca

Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 36) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

*MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWV*  
*RQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA*  
*VYYCARGSGNWGFFDYWGQGLTVTVSS*

5 Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 37) excluyendo el péptido señal:

*QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWV*  
*RQAPGKGLEWVAVIWYDG*  
*SNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGNWGFFDYWG*  
*QGLTVTVSS*

10 V<sub>H</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 38): GFTFSSYD  
V<sub>H</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 39): IWYDGSNK  
V<sub>H</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 40): ARGSGNWGFFDY

**1F5 VK #2 (VK ID-16; JK1)**

15 Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 41)

*Atgagggtcctcgtcagctcctggggtcctcgtcctgtttccagggtccagatgtgacatccagatgaccagctcctcatcctc*  
*actgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcgggcgagtcagggtattagcaggtggttagcctggtatcagcagaaac*  
*cagagaaagccctaagtcctgatctatgctgcatccagtttgc aaagtggggtccatcaagggtcagcggcagtgatctgggac*  
*agatttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgc aacttactgccaacagtataatactaccctggagcttccggcc*  
*aagggaccaagggtggaatcaaa*

20 Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 42) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

*MRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQ*  
*KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPR*  
*TFGQGTKVEIK*

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 43) excluyendo el péptido señal:

25 *DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV*  
*PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPRTFGQGTKVEIK*

30 V<sub>L</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 44): QGISRW  
V<sub>L</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 45): AAS  
V<sub>L</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 46): QQYNTYPR

**1H8 VH (VH 3-33; D7-27; JH4)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 47)

35 *Atggagtftgggctgagctgggtttcctcgttctctttaaagggtgtccagtgatgagctgagctgggtgagctctgggggaggcgt*  
*ggtccagcctgggaggtccctgagactctcgtgagcgtctggattcacctcaatctatgacatgactgggtccgccaggctc*  
*caggcaaggggctggagtggtggcagttatggtatgatggaagtaataactatgacagactccgtgaaggccgattcacct*  
*ctccagagacaatccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacattttagagccgagacacggctgtgattactgtgcgagaggta*  
*ctcactgggggtactttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtctcctca*

Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 48) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

*MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNIYDMHWVR*  
*QAPGKGLEWVAVIWYDGSNQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNILRAEDTAV*  
*YYCARGTHWGYFDYWGQGLTVTVSS*

40 Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 49) excluyendo el péptido señal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNIYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDG  
SNQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNILRAEDTAVYYCARGTHWGYFDYWGQ  
 GTLVTVSS

V<sub>H</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 50): GFTFNIYD  
 V<sub>H</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 51): IWYDGSNQ  
 V<sub>H</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 52): ARGTHWGYFDY

**1H8 VK (VK ID-16; JK1)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 53)

Atgagggtcctcgtcagctcctgggctcctgctctgttccagggtccagatgtgacatccagatgaccagctcctcctc  
 actgtctcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcggcgagtcagggtattagcagctggttagcctggtatcagcagaaac  
 cagagaaagccctaagtcctgatctatgctgcatccaatttgcaagtggggtccatcaagggtcagcggcagtggtatctgggac  
 agattcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgcaacttactgccaacagtataatgtaccctcggacgttcggcc  
 aagggaaccaaggtggaatcaaa

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 54) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ  
KPEKAPKSLIYAASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPRT  
 FGQGTKVEIK

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 55) excluyendo el péptido señal:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASNLQSGV  
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPRTFGQGTKVEIK

V<sub>L</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 56): QGISSW  
 V<sub>L</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 57): AAS  
 V<sub>L</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 58): QQYNSYPRT

**1G5 VH (VH 3-33; D6-19; JH2)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 59)

Atggagttgggctgagctgggtttctcgttctctttaaagggtgtccagtgatcaggtgcaactggtggagctctgggggaggcgtg  
 gtccagctgggagggtcctgagactctcctgtgcagcgtctggattcagctcagtagctatggcatgactgggtccgccagctcc  
 aggcaagggactggagtggtggcactctctatggtatgtaggtagccataaagactttgagactccgtgaaggccgattcaccatct  
 ccagagacaattccaagaacacgctagatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagagag  
 ggttagcagtagctggtcactgtactctgctctggggccgtggcaccctggtcactgtctcctca

Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 60) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

MEFGLSWYFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVR  
QAPGKGLEWVALLWYDGSHKDFADSVKGRFTISRDNKNTLDLQMNLSRAEDTAV  
 YYCAREGLAVPGHWYFDLWGRGTLVTVSS

Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 61) excluyendo el péptido señal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVALLWYDG  
SHKDFADSVKGRFTISRDNKNTLDLQMNLSRAEDTAVYYCAREGLAVPGHWYFDL  
 WGRGTLVTVSS

V<sub>H</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 62): GFSFSSYG  
 V<sub>H</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 63): LWYDGSHK  
 V<sub>H</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 64): AREGLAVPGHWYFDL

**1G5 VK (VK 1-13; JK1)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 65)

Atgaggggtccccgctcagctcctgggctctgctgctgctgctgctccagggtgccagatgtgccatccagttgaccagctcctccatcctc  
 cctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtgcgggcaagtcagggcattagcagtgcttagcctggatcagcagaaac  
 cagggaaagctcctaagctcctgatctatgatgctccagttggaaagtggggtccatcaagggtcagcggcagtgatctgggac  
 agattcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgaacttactgtcaacagtttaactaccctcggacgttcggcc  
 aagggaaccaaggtggaaatcaaa

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 66) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

MRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQK  
PGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNTYPRTF  
 GQGTKVEIK

5

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 67) excluyendo el péptido señal:

AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGV  
 PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNTYPRTFGQGTKVEIK

10

V<sub>L</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 68): QGISSA

V<sub>L</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 69): DAS

V<sub>L</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 70): QQFNTYPRT

15 **2G9 VH (VH 3-33; D1-7; JH4)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 71)

Atgaggttgggctgagctgggtttcctcgtgctctttaaagaggtgtccagtgatcaggtgcagttggtggagctggtggggaggcgtg  
 gtccagcctgggaggtcctgcactctcctgtgcagcgtctggattcacctcagtagccatgacatacactgggtccgccaggtc  
 caggcaaggggctggagtggtggcagttatggaatgatggaagtaataaactatgcagactccgtgaagggccgattcaccat  
 ctccagagacaattccagcaactcgtgtttctgcaaatgaaccgctgagagccgaggacagggctgtgtattattgtgtgagaggaa  
 ctgctgacctgaacactgggaccagggaaacctggtcaccgtctcctca

20

Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 72) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSSHDIHWVR  
QAPGKGLEWVAVIWN DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSTNSLFLQMNSLRAEDTAVY  
YCVRGTDLEHWDQGLTVTVSS

25

Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 73) excluyendo el péptido señal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSSHDIHWVRQAPGKGLEWVAVIWN DGS  
NKYYADSVKGRFTISRDNSTNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCVRGTDLEHWDQGL  
 TVTVSS

30

V<sub>H</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 74): GFTLSSHD

V<sub>H</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 75): IWN DGSNK

V<sub>H</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 76): VRGTDLEHWDQ

35 **2G9 VK (VK 1D-16; JK4)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 77)

Atgaggggtcctcgtcagctcctgggctcctgctgctgtttccagggtgccagatgtgacatccagatgaccagctcctccatcctc  
 actgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtgcgggcagtcagggattagcagctggttagcctggatcagcagaaac  
 cagagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagttgcaagtggggtccatcaagggtcagcggcagtgatctgggac  
 agattcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgaacttactgtccaacagttataatgtaccctctcactttcggcg  
 gagggaccaaggtggagatcaaa

40

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 78) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ  
KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLI  
 FGGGTKVEIK

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 79) excluyendo el péptido señal:

5           DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV  
 PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPLTFGGGTKVEIK

V<sub>L</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 80): QGISSW

V<sub>L</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 81): AAS

V<sub>L</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 82): QQYNSYPLT

10

**3A10 VH (VH 3-33; D3-10; JH3)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 83)

15           Atggagttgggctgagctgggtttctctggtctcttttaagaggtgtccagtgtcaggtgcagctggtggagtctgggggagggct  
 ggtccagcctgggaggtccctgagactctctgtgcagcgtctggattcacctcagtcattatggcatgcactgggtccgccaggtc  
 caggcaaggggcccggagtggtggcaattatggtatgatggaagtaataaatactatgcagactccgtgaaggccgattcacat  
 ctccagagacaattccaagaacacgctggatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaga  
 tggatggactactatggttcggggactaatgftttgatctggggccaagggaacaatggtcaccgtctctca

20           Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 84) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHYGMHWV  
RQAPGKGPEWVAIIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLDLQMNSLRAEDTAV  
YYCARDGWTTMVRGLNVFDIWGQGMVTVSS

25           Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 85) excluyendo el péptido señal:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSHYGMHWVRQAPGKGPEWVAIIWYDG  
SNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLDLQMNSLRAEDTAVYYCARDGWTTMVRGLNV  
FDIWGQGMVTVSS

V<sub>H</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 86): GFTFSHYG

V<sub>H</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 87): IWYDGSNK

V<sub>H</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 88): ARDGWTTMVRGLNVFDI

30

**3A10 VK #1 (VK 1D-16; JK5)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 89)

35           Atgagggctctcgtcagctcctgggctctcgtcgtctgtttccaggtgccagatgtgacatccagatgaccagctcctccatctc  
 actgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcggggcagtcaggatattagcagctggttagcctggatcagcagaaac  
 cagagaaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagtttcaaagtgggtcccatcaagggtcagcggcagtggtatctgggac  
 agatttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgaacttattactgccaacagtataatagtaccctcccacctcggcc  
 aagggacacgactggagattaaa

40           Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 90) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQQ  
KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPT  
 FGQGRLEIK

40

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 91) excluyendo el péptido señal:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV  
 PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGRLEIK

V<sub>L</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 92): QDISSW  
 V<sub>L</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 93): AAS  
 V<sub>L</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 94): QQYNSYPPT

5 **3A10 VK #4 (VK 1-13; JK5)**

También se encontró que una cadena ligera adicional era activa del siguiente modo (aunque solo se usó la cadena ligera anterior (3H8-1B11 VK #1) en los ejemplos anteriores):

10 Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 95)

Atgagggctctcgtcagctcctgggctctgctgctctggctcccaggtgccagatgtgccatccagttgaccagctcctcatctc  
 cctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggcaagtcagggcattagcagtgcttagcctggatcagcagaaac  
 cagagaagcccctaagtcctgatctatgctgcatccagtttgcaagtggggtccatcaaggttcagcggcagtggtatctgggac  
 agatttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgcaacttactgccaacagtataatagttaccctcccaccttcggcc  
 aaggacacgactggagattaaa

15 Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 96) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

*MRVLAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQK*  
*PEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTF*  
 GQGRLEIK

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 97) excluyendo el péptido señal:

20 *AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV*  
*SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGQGRLEIK*

V<sub>L</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 98): QGISSA  
 V<sub>L</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 99): AAS  
 V<sub>L</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 100): QQYNSYPPT

25 **3H12 VH (VH 3-33; D7-27; JH4)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 101)

atggagttfgggctgagctgggtttctcgttctctttaagaggtgtccagtgctcaggtgcagctggaggagctctggggaggcgtg  
 gtccagcctgggaggtcctgagactctcctgtgcaacgtctgattcaccctcagtagctatgacatgcactgggtccgccaggctcc  
 aggcaaggggctggagtggtggcagttattggatgatggaagtaataaactatgcagactccgtgaagggccgattcaccatct  
 ccagagacaattccaagaacacgctgtatctccaatgaacagcctgggagacaggacacggctgtgtactgtgcgagaggta  
 gtgtaactggggtttcttctgactactggggccagggaacctgtcaccgtctctca

30 Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 102) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

*MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSSYDMHWVR*  
*QAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLGDEDTAV*  
*YYCARGSGNWGFFDYWGQGLTVTVSS*

35 Secuencia de aminoácidos de V<sub>H</sub> (SEQ ID NO: 103) excluyendo el péptido señal:

*QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATSGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDG*  
*SNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLGDEDTAVYYCARGSGNWGFFDYWG*  
 QGLTVTVSS

40 V<sub>H</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 104): GFTFSSYD  
 V<sub>H</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 105): IWDGSKN  
 V<sub>H</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 106): ARGSGNWGFFDY

45 **3H12 VK #2 (VK ID-16; JK1)**

Secuencia de ácidos nucleicos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 107)

Atgagggctctcgtcagctcctggggctcctgctctgtttcccagggtccagatgtgacatccagatgaccagctcctcctc  
 actgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgtcggcgagtcagggtattagcaggtggtagcctggatcagcagaaac  
 cagagaaagccctaagtcctgcatctatgctgcatccagtttgcaaaagtggggtccatcaagggtcagcggcagtggtatctgggac  
 agattcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagatttgcacttactgccaacagtataatactaccctcggacgttcggcc  
 aagggaccaaggtggaaatcaaa

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 108) (incluyendo el péptido señal en cursiva subrayado):

*MRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQ*  
 KPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPR  
 FGQGTKVEIK

5

Secuencia de aminoácidos de V<sub>L</sub> (SEQ ID NO: 109) excluyendo el péptido señal:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGV  
 PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPRTFGQGTKVEIK

10

V<sub>L</sub> CDR1 (SEQ ID NO: 110): QGISRW

V<sub>L</sub> CDR2 (SEQ ID NO: 111): AAS

V<sub>L</sub> CDR3 (SEQ ID NO: 112): QQYNTYPR

LOS ALINEAMIENTOS SE MUESTRAN EN LAS FIGS 15 Y 16

15

### **Ejemplo 10**

#### **Estudio de primates no humanos *in vivo***

20 Para evaluar la tolerancia del mAb 1F5 anti-CD27 humana en primates no humanos, se trataron 3 monos  
 cinomolgos con una dosis i.v. de 1, 3 o 10 mg/kg de 1F5. Los animales se siguieron durante 29 días. Los linfocitos  
 totales (basándose en el tamaño de dispersión lateral y frontal), linfocitos B de memoria (CD20+ y CD95 claro) y  
 monocitos (basándose en el tamaño de dispersión lateral y frontal) se tiñeron con anticuerpo anti-IgG humana (línea  
 25 en negrita) y se compararon con controles no teñidos (histograma sombreado). Los resultados se muestran en la  
 Figura 17. Estos resultados muestran que el mAb 1F5 se unió a la superficie de linfocitos circulantes que se sabe  
 que expresan CD27 durante la duración entera del estudio. Los monocitos, células que no expresan CD27, no  
 tuvieron unión a 1F5.

30 Además, para determinar el efecto de 1F5 sobre poblaciones de linfocitos circulantes, los linfocitos se tiñeron con  
 marcadores de subconjunto y se representó el % de células positivas frente al tiempo en la Figura 17 para cada  
 animal tratado a las diferentes dosis (puntos cuadrados = 1 mg/kg; puntos circulares = 3 mg/kg; puntos triangulares  
 = 10 mg/kg). Los resultados se muestran en la Figura 18.

35 Conjuntamente, los resultados de estos estudios, mostrados en las Figuras 17 y 18, demostraron que 1F5 fue bien  
 tolerado y no agotó significativamente los linfocitos circulantes (distinto de cierto agotamiento transitorio de linfocitos  
 NK) después de una única dosis de 1 - 10 mg/kg. Además, no hubo elevación en las temperaturas corporales y no  
 hubo niveles detectables de TNF- $\alpha$ , IL-6 o IL-1 $\beta$ .

### **Ejemplo 11**

#### **Los mAb anti-CD27 mejoraron la proliferación y activación de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno**

##### **Tinción de pentámeros en células de sangre periférica y esplenocitos de ratón**

45 Se inyectaron ratones transgénicos para CD27 humana (huCD27-Tg) por vía intravenosa con 5 mg de ovoalbúmina  
 de pollo y el panel de anticuerpos completamente humanos que reconocen CD27 humana se generó como en el  
 Ejemplo 1 (mAb humanos de CD27). Se incluyeron clon anti-CD27 de ratón de rata AT 124 e IgG1 humana  
 irrelevante como controles positivos y negativos, respectivamente. Cada anticuerpo (250  $\mu$ g) se co-inyectó con  
 ovoalbúmina el día 0 y 250  $\mu$ g adicionales de anticuerpo solo en el día 1. Se recogieron sangre periférica y células  
 50 del bazo en el día 7. Se usaron esplenocitos ( $1 \times 10^6$ ) o sangre completa (100  $\mu$ l) para la tinción. Después de  
 bloquear el receptor Fc, las células se tiñeron con 10  $\mu$ l de H-2Kb/SIINFEKL (SEQ ID NO: 119), un complejo  
 tetramérico de MHC de ratón complejo con el epítipo de linfocitos T del péptido de ovoalbúmina (Beckman  
 Coulter) o un complejo pentamérico similar (Proimmune), mAb anti-CD8 (eBioscience) y anti-huCD27 o mAb anti-  
 55 msCD27 (BD Biosciences) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células se lisaron luego con RBC, se  
 lavaron y se fijaron y se adquirieron al menos 100.000 eventos en Flow Cytometer LSR (BD Biosciences). Se  
 determinó la fracción de células positivas para tetrámero o pentámero en la población regulada con CD8<sup>+</sup> o CD27<sup>+</sup>.  
 Los resultados se muestran en las Figuras 19 y 21 a partir de las cuales puede verse que los anticuerpos anti-CD27

mejoraron significativamente las respuestas inmunitarias.

### **Ejemplo 12**

#### **5 Ensayo ELISPOT**

Se dispusieron esplenocitos ( $2,5 \times 10^5$  y  $0,5 \times 10^5$ ) de la preparación de tinción de pentámero del Ejemplo 8 anterior en una placa recubierta con anticuerpo monoclonal (mAb) anti-IFN $\gamma$  en pocillos por triplicado después de la lisis con RBC. Se añadió el péptido SIINFEKL (SEQ ID NO: 119) a una concentración final de 2  $\mu$ g/ml. Se estableció un control de referencia para cada muestra por triplicado en ausencia del péptido. La estimulación se mantuvo a 37 °C en una estufa de incubación de cultivo de tejido durante la noche. Se realizó detección ELISPOT usando un kit de ELISPOT (BD Biosciences) siguiendo el protocolo del fabricante. Se contó el número de manchas de IFN $\gamma$ . Los resultados se muestran en las Figuras 20 y 21, a partir de las cuales puede verse que los mAb anti-CD27 mejoraron significativamente la actividad de los linfocitos T.

### **Ejemplo 13**

#### **El mAb anti-CD27 mejora las respuestas de linfocitos T a un antígeno de vacuna**

Se inmunizaron ratones transgénicos HuCD27 con 5  $\mu$ g (s.c.) de la vacuna dirigida a APC que comprende un anticuerpo anti-IgG DEC-205 de ratón fusionado con ovoalbúmina (OVA) (denominado  $\alpha$ -mDEC-205-OVA), en combinación con el mAb anti-CD27 humana 1F5 (i.p.) a diversas dosis (25, 50, 100, 200 o 400  $\mu$ g). Una semana después, los esplenocitos se analizaron para la reactividad de linfocitos T CD8+ al péptido OVA SIINFEKL (SEQ ID NO: 119) (péptido OVA 257-264) por tinción de tetrámeros (% de tetrámeros positivos para todas las CD8+ mostradas) y ELISPOT de IFN- $\gamma$  por el procedimiento que se describe generalmente en los Ejemplos 8 y 9, respectivamente. Los resultados se muestran en las Figuras 22A-C, en las que la Figura 22A muestra el protocolo usado, la Figura 22B muestra los resultados del experimento de tinción de tetrámeros y la Figura 22C muestra los resultados del experimento ELISPOT de IFN- $\gamma$ . Estos resultados indican que el mAb 1F5 humano coadministrado mejoró significativamente las respuestas de linfocitos T al componente de vacuna administrado.

### **Ejemplo 14**

#### **Efecto sinérgico del mAb anti-CD27 (1F5) y agonista de TLR (Poly IC) sobre las respuestas de linfocitos T a la vacuna (anti-DEC205-OVA)**

Se inyectaron por vía intraperitoneal compañeros de camada de ratones huCD27-Tg (transgénicos) y no mutantes (WT) con el mAb anti-CD27 1F5 (50  $\mu$ g) el día -3 y luego por vía subcutánea mediante la inyección de 4 patas con anti-mDec205-OVA (5  $\mu$ g) más Poly IC 0, 25, 50 o 100  $\mu$ g el día 0. Los bazoos se recogieron el día 7 y se evaluaron por tinción de tetrámeros, ELISPOT de IFN- $\gamma$  e ICS de IFN- $\gamma$ . Se calcularon la media  $\pm$  DE de ICS de IFN- $\gamma$  positivo entre linfocitos T CD8 regulados de 3 ratones por grupo y se recogió un panel de gráficas de puntos representativas. Los resultados, mostrados en las Figuras 23A-D, indican que el mAb anti-CD27 humana actuó sinérgicamente con el agonista de TLR3 Poly IC para mejorar las respuestas de linfocitos T al componente de vacuna administrado.

### **Ejemplo 15**

#### **Administración de mAb anti-CD27 antes de la vacuna dirigida a Dec205 en ausencia o presencia de agonista de TLR**

Se inyectaron ratones huCD27-Tg y compañeros de camada no mutantes (WT) por vía intraperitoneal con el mAb anti-CD27 (50  $\mu$ g) en diversos días con respecto a la vacuna como se indica en la Figura 28 y por vía subcutánea mediante la inyección en 4 patas con anti-mDec205-OVA (5  $\mu$ g) más o menos agonista de TLR Poly IC-LC (20  $\mu$ g) en el día 0. Los bazoos se recogieron en el día 7 y se evaluaron mediante tinción de tetrámeros y ELISPOT de IFN $\gamma$ . En las Figuras 24 y 25 se muestra un panel representativo de tinción de tetrámeros entre linfocitos T CD8 regulados. ELISPOT de IFN $\gamma$  mostró un patrón similar.

Estos resultados muestran que, sorprendentemente, cuando el anticuerpo anti-CD27 se administra en combinación con una vacuna en presencia o ausencia de agonista de TLR, la activación de linfocitos T es mayor cuando el anticuerpo se administra antes de la vacuna, por ejemplo, un día o más antes de que se administre la vacuna (antígeno).

### **Ejemplo 16**

#### **El mAb anti-CD27 combinado con la activación de TCR activa linfocitos T de ratones transgénicos para CD27 humana**

65

Para evaluar la capacidad de activación de linfocitos T del mAb 1F5, se purificaron linfocitos T del bazo de ratones hCD27-Tg por selección negativa con perlas. Las células se marcaron con CFSE y se incubaron con 0,2 µg/ml de mAb anti-CD27 humano 1F5 o control de isotipo durante 3 días. Se pasó anti-IgG humana de reticulación a través de una columna de eliminación de endotoxina antes de su uso. En las Figuras 26 y 27 se muestra la dilución de ICS de IFN $\gamma$  y CSFE entre linfocitos T CD8 y CD4. ICS de TNF $\alpha$  mostró el mismo patrón que IFN $\gamma$ . Como se muestra en la Figura 26 y 27, cuando se combina con activación de TCR, el mAb 1F5 induce eficazmente la proliferación y producción de citocinas de linfocitos T *in vitro*. Los datos muestran que se requirieron tanto la reticulación con anti-IgG humana como la activación del receptor de linfocitos T con el mAb anti-CD3 para la proliferación inducida por 1F5 y la producción de citocina.

### **Ejemplo 17**

#### **El mAb anti-CD27 mejora la eficacia de vacuna en un modelo de exposición a melanoma MO4**

Para evaluar la actividad antitumoral *in vivo*, huCD27-Tg y control WT, 8 ratones por grupo, se inocularon por vía subcutánea con  $0,3 \times 10^5$  células MO4 en el día 0. En el día 5 y 12, estos ratones se inyectaron por vía intraperitoneal con el mAb anti-CD27 1F5 (50 µg); en el día 8 y 15, dosis adicionales de CD27 HuMab (50 µg) y se vacunaron con anti-mDec205-OVA (5 µg). Se midió el crecimiento tumoral con compases calibradores 2 veces por semana. Los resultados se muestran en la Figura 24.

En un estudio adicional, huCD27-Tg y control WT, 5 ratones por grupo, se inocularon por vía subcutánea con  $1 \times 10^5$  células MO4 en el día 0. En el día 5 y 12, estos ratones se vacunaron con anti-mDec205-OVA (5 µg) más el agonista de TLR Poly IC-LC (10 µg) por vía intraperitoneal. En los días 6 y 13, los ratones se inyectaron con el mAb anti-CD27 1F5 (50 µg). El crecimiento tumoral se midió con compases calibradores 2 veces por semana según se indica en el protocolo ilustrado en la Figura 285A. Los resultados, mostrados en las Figuras 28B, C y D, muestran el efecto del no tratamiento (Figura 28B), tratamiento con vacuna sola (Figura 28C) o tratamiento con vacuna en combinación con tratamiento anti-CD27 (Figura 28D) sobre el tamaño del tumor en los ratones en función del número de días después de la inoculación del tumor. Los resultados demuestran que el tratamiento de combinación con el mAb anti-CD27 (1F5) prolongó significativamente la supervivencia de los ratones expuestos al tumor.

### **Ejemplo 18**

#### **1F5 presenta potente actividad antitumoral en un modelo de exposición a tumor de ratón transgénico singénico del linfoma B de BCL $_1$**

Para evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de 1F5, grupos de 9-10 ratones transgénicos hCD27 (referencia Balb/c) se expusieron a  $10^7$  células de linfoma B BCL $_1$  administradas por vía intravenosa en el día 0. Los animales se trataron luego con 5 dosis del mAb anti-CD27 humana 1F5 como se indicó. Como se muestra en las Figuras 29A y 29B, se prolongó significativamente la supervivencia de ratones expuestos a tumor, en una forma dependiente de la dosis.

### **Ejemplo 19**

#### **Destrucción de tumores en modelo de ratón SCID de xenoinjerto de Raji**

Se mantuvieron ratones CB.17 SCID (comprados en Taconic) en una instalación de ratones libre de patógenos. Se inyectaron células Raji de linfoma ( $1 \times 10^5$ ) por vía subcutánea en ratones SCID, 4 ratones por grupo. En el día 6, estos ratones se trataron con los mAb humanos para CD27 mediante administración intraperitoneal, 0,5 mg por dosis y se dosificaron dos veces por semana durante 3 semanas. Se midió el crecimiento tumoral con compases calibradores 3 veces por semana. Los resultados del crecimiento tumoral y los análisis de Kaplan-Meier se muestran en la Figura 30A y 30B, a partir de las cuales puede verse que los mAb anti-CD27 prolongaron significativamente la supervivencia de los ratones expuestos al tumor.

En un experimento adicional, se mantuvieron ratones CB.17 SCID (comprados en Taconic) en una instalación de ratones libre de patógenos. Se inyectaron células Raji de linfoma humano ( $5 \times 10^5$ ) por vía subcutánea en ratones SCID en el día 0, 6 ratones por grupo. En el día 5, estos ratones se trataron con el mAb anti-CD27 1F5 mediante administración intraperitoneal, 0,033, 0,1 o 0,3 mg por dosis y se dosificaron dos veces por semana durante 3 semanas. Se midió el crecimiento tumoral con compases calibradores 2 veces por semana.

Los resultados, mostrados en la Figura 31A, indican que el mAb anti-CD27 (1F5) inhibió significativamente el crecimiento tumoral y así prolongó significativamente la supervivencia de los ratones expuestos al tumor. En la Figura 31B también se proporciona una gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier de los datos, que muestra que la mediana de la supervivencia aumentó en al menos 10 días en los ratones del grupo tratado en comparación con el grupo de control. Se realizó otro experimento de xenoinjerto con 1G5 y los resultados se muestran en la Figura 32.

**Ejemplo 20****Destrucción de tumores en modelo de ratón SCID de xenoinjerto de Daudi**

5 Se mantuvieron ratones CB.17 SCID (comprados en Taconic) en una instalación de ratones libre de patógenos. Se inyectaron células Daudi de linfoma humano ( $1 \times 10^6$ ) por vía subcutánea en ratones SCID en el día 0, 6 ratones por grupo. En el día 5, estos ratones se trataron con el mAb humano anti-CD27 1F5 mediante administración intraperitoneal, 0,033, 0,1 o 0,3 mg por dosis y se dosificaron dos veces por semana durante 3 semanas. Se midió el crecimiento tumoral con compases calibradores 2 veces por semana.

10 Los resultados, mostrados en la Figura 33, indican que el mAb anti-CD27 (1F5) inhibió significativamente el crecimiento tumoral (Figura 33A) y así prolongó significativamente la supervivencia de los ratones expuestos al tumor (gráfica de Kaplan-Meier en la Figura 33B).

**Ejemplo 21****El mAb anti-CD27 modificado para no unirse a receptores Fc no mejora las respuestas de linfocitos T a un antígeno de vacuna**

20 Se inmunizaron ratones HuCD27 transgénicos con 5  $\mu$ g (s.c.) de vacuna dirigida a APC que comprende un anticuerpo anti-IgG DEC-205 de ratón fusionado con ovoalbúmina (OVA) (denominado  $\alpha$ -mDEC-205-OVA), en combinación con el mAb humano anti-CD27 1F5 (i.p.) o mutante de mAb 1F5 (porción Fc mutada para prevenir la unión al receptor Fc) o mAb de IgG de control. Una semana después, los esplenocitos se analizaron para la reactividad de linfocitos T CD8+ con el péptido OVA SIINFELK (SEQ ID NO: 119) (péptido OVA 257-264) por ELISPOT de IFN- $\gamma$  y por el procedimiento como se describe generalmente.

25 Los resultados, mostrados en la Figura 34, demuestran que el mAb 1F5 humano alterado no mejora las respuestas de linfocitos T a la vacuna y así sería un agente eficaz para bloquear la vía CD70/CD27.

30

**RESUMEN DEL LISTADO DE SECUENCIAS**

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
1	CD27 humana (N.º de acceso de GenBank: AAH12160.1)
2	CD70 humana (N.º de acceso de GenBank: NP_001243)
3	Se proporciona la secuencia de la línea germinal 3-33 de V <sub>H</sub> (N.º de acceso de GenBank AAP44382)
4	Se proporciona la secuencia de la línea germinal 3-7 de V <sub>H</sub> (N.º de acceso de GenBank AAP44389)
5	3H8-1B11 VH ácido nucleico
6	3H8-1B11 VH aminoácido incluyendo el péptido señal
7	3H8-1B11 VH aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
8	3H8-1B11 VH CDR1 aminoácido
9	3H8-1B11 VH CDR2 aminoácido
10	3H8-1B11 VH CDR3 aminoácido
11	3H8-1B11 VL #2 ácido nucleico
12	3H8-1B11 VL #2 aminoácido incluyendo el péptido señal
13	3H8-1B11 VL #2 aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
14	3H8-1B11 VL #2 CDR1 aminoácido
15	3H8-1B11 VL #2 CDR2 aminoácido
16	3H8-1B11 VL #2 CDR3 aminoácido
17	3H8-1B11 VL #3 ácido nucleico
18	3H8-1B11 VL #3 aminoácido incluyendo el péptido señal

ES 2 608 475 T3

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
19	3H8-1B11 VL #3 aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
20	3H8-1B11 VL #3 CDR1 aminoácido
21	3H8-1B11 VL #3 CDR2 aminoácido
22	3H8-1B11 VL #3 CDR3 aminoácido
23	2C2-1A10 VH ácido nucleico
24	2C2-1A10 VH aminoácido incluyendo el péptido señal
25	2C2-1A10 VH aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
26	2C2-1A10 VH CDR1 aminoácido
27	2C2-1A10 VH CDR2 aminoácido
28	2C2-1A10 VH CDR3 aminoácido
29	2C2-1A10 VL ácido nucleico
30	2C2-1A10 VL aminoácido incluyendo el péptido señal
31	2C2-1A10 VL aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
32	2C2-1A10 VL CDR1 aminoácido
33	2C2-1A10 VL CDR2 aminoácido
34	2C2-1A10 VL CDR3 aminoácido
35	1F5-1H5 VH ácido nucleico
36	1F5-1H5 VH aminoácido incluyendo el péptido señal
37	1F5-1H5 VH aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
38	1F5-1H5 VH CDR1 aminoácido
39	1F5-1H5 VH CDR2 aminoácido
40	1F5-1H5 VH CDR3 aminoácido
41	1F5-1H5 VL #2 ácido nucleico
42	1F5-1H5 VL #2 aminoácido incluyendo el péptido señal
43	1F5-1H5 VL #2 aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
44	1F5-1H5 VL #1 CDR1 aminoácido
45	1F5-1H5 VL #2 CDR2 aminoácido
46	1F5-1H5 VL #2 CDR3 aminoácido
47	1H8-B4 VH ácido nucleico
48	1H8-B4 VH aminoácido incluyendo el péptido señal
49	1H8-B4 VH aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal

ES 2 608 475 T3

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
50	1H8-B4 VH CDR1 aminoácido
51	1H8-B4 VH CDR2 aminoácido
52	1H8-B4 VH CDR3 aminoácido
53	1H8-B4 VL ácido nucleico
54	1H8-B4 VL aminoácido incluyendo el péptido señal
55	1H8-B4 VL aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
56	1H8-B4 VL CDR1 aminoácido
57	1H8-B4 VL CDR2 aminoácido
58	1H8-B4 VL CDR3 aminoácido
59	1G5-1B9 VH ácido nucleico
60	1G5-1B9 VH aminoácido incluyendo el péptido señal
61	1G5-1B9 VH aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
62	1G5-1B9 VH CDR1 aminoácido
63	1G5-1B9 VH CDR2 aminoácido
64	1G5-1B9 VH CDR3 aminoácido
65	1G5-1B9 VL ácido nucleico
66	1G5-1B9 VL aminoácido incluyendo el péptido señal
67	1G5-1B9 VL aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
68	1G5-1B9 VL CDR1 aminoácido
69	1G5-1B9 VL CDR2 aminoácido
70	1G5-1B9 VL CDR3 aminoácido
71	2G9-1D11 VH ácido nucleico
72	2G9-1D11 VH aminoácido incluyendo el péptido señal
73	2G9-1D11 VH aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
74	2G9-1D11 VH CDR1 aminoácido
75	2G9-1D11 VH CDR2 aminoácido
76	2G9-1D11 VH CDR3 aminoácido
77	2G9-1D11 VL ácido nucleico
78	2G9-1D11 VL aminoácido incluyendo el péptido señal
79	2G9-1D11 VL aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
80	2G9-1D11 VL CDR1 aminoácido

ES 2 608 475 T3

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
81	2G9-1D11 VL CDR2 aminoácido
82	2G9-1D11 VL CDR3 aminoácido
83	3A10-1G10 VH ácido nucleico
84	3A10-1G10 VH aminoácido incluyendo el péptido señal
85	3A10-1G10 VH aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
86	3A10-1G10 VH CDR1 aminoácido
87	3A10-1G10 VH CDR2 aminoácido
88	3A10-1G10 VH CDR3 aminoácido
89	3A10-1G10 VL #1 ácido nucleico
90	3A10-1G10 VL #1 aminoácido incluyendo el péptido señal
91	3A10-1G10 VL #1 aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
92	3A10-1G10 VL #1 CDR1 aminoácido
93	3A10-1G10 VL #1 CDR2 aminoácido
94	3A10-1G10 VL #1 CDR3 aminoácido
95	3A10-1G10 VL #4 ácido nucleico
96	3A10-1G10 VL #4 aminoácido incluyendo el péptido señal
97	3A10-1G10 VL #4 aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
98	3A10-1G10 VL #4 CDR1 aminoácido
99	3A10-1G10 VL #4 CDR2 aminoácido
100	3A10-1G10 VL #4 CDR3 aminoácido
101	3H12-1E12 VH ácido nucleico
102	3H12-1E12 VH aminoácido incluyendo el péptido señal
103	3H12-1E12 VH aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
104	3H12-1E12 VH CDR1 aminoácido
105	3H12-1E12 VH CDR2 aminoácido
106	3H12-1E12 VH CDR3 aminoácido
107	3H12-1E12 VL #2 ácido nucleico
108	3H12-1E12 VL #2 aminoácido incluyendo el péptido señal
109	3H12-1E12 VL #2 aminoácido "maduro" excluyendo el péptido señal
110	3H12-1E12 VL #2 CDR1 aminoácido
111	3H12-1E12 VL #2 CDR2 aminoácido

ES 2 608 475 T3

SEQ ID NO:	DESCRIPCIÓN
112	3H12-1E12 VL #2 CDR3 aminoácido
113	VH CDR3 consenso
114	VL CDR3 consenso
115	VH CDR2 consenso
116	VL CDR2 consenso
117	VH CDR1 consenso
118	VL CDR1 consenso

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal aislado que se une a CD27 humana e induce o mejora una respuesta inmunitaria de linfocitos T, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende SEQ ID NO: 38, una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende SEQ ID NO: 39, una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende SEQ ID NO: 40, una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende SEQ ID NO: 44, una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende SEQ ID NO: 45 y una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende SEQ ID NO: 46.
2. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende:
- (i) una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 37 y 43, respectivamente;
  - (ii) una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprenden una secuencia de aminoácidos al menos el 95 % idéntica a las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 37 y 43, respectivamente; o
  - (iii) una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera codificadas por secuencias de ácidos nucleicos al menos el 90 % idénticas a las secuencias de ácidos nucleicos expuestas en SEQ ID NOs: 35 y 41, respectivamente.
3. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera que comprenden las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 37 y 43, respectivamente.
4. El anticuerpo monoclonal aislado de la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera codificado por las secuencias de ácidos nucleicos expuestas en SEQ ID NOs: 35 y 41, respectivamente.
5. El anticuerpo monoclonal aislado de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo presenta al menos una de las siguientes propiedades:
- (a) bloquea la unión de sCD70 a CD27 al menos el 70 % a una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml;
  - (b) se une a CD27 humana con una constante de disociación en equilibrio  $K_d$  de  $10^{-9}$  M o menos, o alternativamente, una constante de asociación en equilibrio  $K_a$  de  $10^{+9}$  M<sup>-1</sup> o mayor;
  - (c) induce citotoxicidad mediada por el complemento (CDC) específica de células que expresan CD27 al menos el 10 % a una concentración de anticuerpo de 3 µg/ml y aproximadamente el 6 % de complemento de suero de conejo;
  - (d) induce lisis específica de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) de células que expresan CD27 al menos el 10 % a una concentración de anticuerpo de 3 µg/ml y relación de células efectoras:diana de 75:1;
  - (e) mejora la mediana de la supervivencia al menos el 20 % en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) después de la inoculación con células tumorales *in vivo* ( $5 \times 10^5$  células Raji o  $1 \times 10^6$  células Daudi) cuando se administran a 0,3 mg (i.p.) al menos dos veces a la semana durante 3 semanas en comparación con los ratones a los que no se les administra anticuerpo;
  - (f) induce o mejora respuestas inmunitarias específicas de antígeno *in vivo* en combinación con una vacuna o antígeno endógeno;
  - (g) induce o mejora respuestas inmunitarias TH1 específicas de antígeno *in vivo* en combinación con una vacuna o antígeno endógeno;
  - (h) induce o mejora la proliferación o activación de linfocitos T específicos de antígeno *in vivo* en combinación con una vacuna o antígeno endógeno;
  - (i) induce o mejora la actividad de linfocitos T cuando se combina con activación simultánea, separada o consecutiva de TCR;
  - (j) produce menos del 50 % de reducción de linfocitos T CD3+ (distintos de linfocitos NK) en macacos cuando se administra a 3 mg/kg (i.v.) durante el periodo de 29 días inmediatamente tras la administración; o
  - (k) produce menos del 50 % de reducción de linfocitos B de memoria en macacos cuando se administra a 3 mg/kg (i.v.) durante el periodo de 29 días inmediatamente tras la administración.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo está seleccionado de:
- (i) un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD e IgE; y/o
  - (ii) un anticuerpo humano, humanizado o quimérico.
7. Una molécula biespecífica que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, unida a una segunda molécula que tiene una especificidad de unión que es diferente del anticuerpo, en la que opcionalmente la segunda molécula se une a un receptor Fc, un receptor NK, o un receptor de linfocitos T

seleccionado de CD3, CD40 y CD25.

8. Un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada y/o ligera del anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

9. Una célula transformada con el vector de expresión de la reivindicación 8.

10. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o la molécula biespecífica de la reivindicación 7 y un vehículo.

11. La composición de la reivindicación 10, que comprende además:

(i) un adyuvante y/o agente inmunoestimulante, opcionalmente en la que el agente inmunoestimulante está seleccionado de ligando CD40, ligando FLT 3, citocinas, factores estimulantes de colonias, un anticuerpo anti-CTLA-4, LPS (endotoxina), ARNms, ARNbc, Bacille Calmette-Guerin (BCG), clorhidrato de levamisol, inmunoglobulinas intravenosas y un agonista del receptor tipo Toll (TLR), tal como un agonista de TLR3, un agonista de TLR4, un agonista de TLR5, un agonista de TLR7, un agonista de TLR8 y un agonista de TLR 9; o

(ii) un agente inmunosupresor, otro anticuerpo y/o un antígeno, opcionalmente en la que el antígeno comprende un componente de un patógeno, un alérgeno, un autoantígeno o un antígeno de tumor, tal como  $\beta$ hCG, gp100 o Pmel17, HER2/neu, WT1, mesotelina, CEA, gp100, MART1, TRP-2, melan-A, NY-ESO-1, NY-BR-1, NY-CO-58, MN (gp250), idiotipo, MAGE-1, MAGE-3, MAGE-A3, tirosinasa, telomerasa, antígenos SSX2, antígenos MUC-1 y antígenos de tumor derivados de células germinales.

12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en un método de tratamiento de un cáncer seleccionado de leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, eritroleucemia monocítica mielomonocítica promielocítica de mieloblastos, leucemia crónica, leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células del manto, linfoma del sistema nervioso central primario, linfoma de Burkitt, linfoma de linfocitos B de la zona marginal, linfoma policitemia vera, enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin, mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de las cadenas pesadas, tumores sólidos, sarcomas y carcinomas, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabdomiomasarcoma, sarcoma de colon, carcinoma colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de las vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de pulmón no de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma esofágico, carcinoma de células basales, cáncer de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, cáncer de cerebro y sistema nervioso central (SNC), cáncer de cuello uterino, coriocarcinoma, cánceres colorrectales, cáncer de tejido conjuntivo, cáncer del aparato digestivo, cáncer endometrial, cáncer de esófago, cáncer de ojo, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, neoplasia intraepitelial, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (de células pequeñas, de células grandes), melanoma, neuroblastoma; cáncer de cavidad bucal (por ejemplo, labios, lengua, boca y faringe), cáncer de ovarios, cáncer pancreático, retinoblastoma, rabdomiomasarcoma, cáncer rectal; cáncer del aparato respiratorio, sarcoma, cáncer de piel, cáncer de estómago, cáncer testicular, cáncer de tiroides, cáncer uterino y cáncer del aparato urinario.

13. Un método de detección de la presencia o ausencia de CD27 en una muestra biológica, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo se marca con una sustancia detectable; y

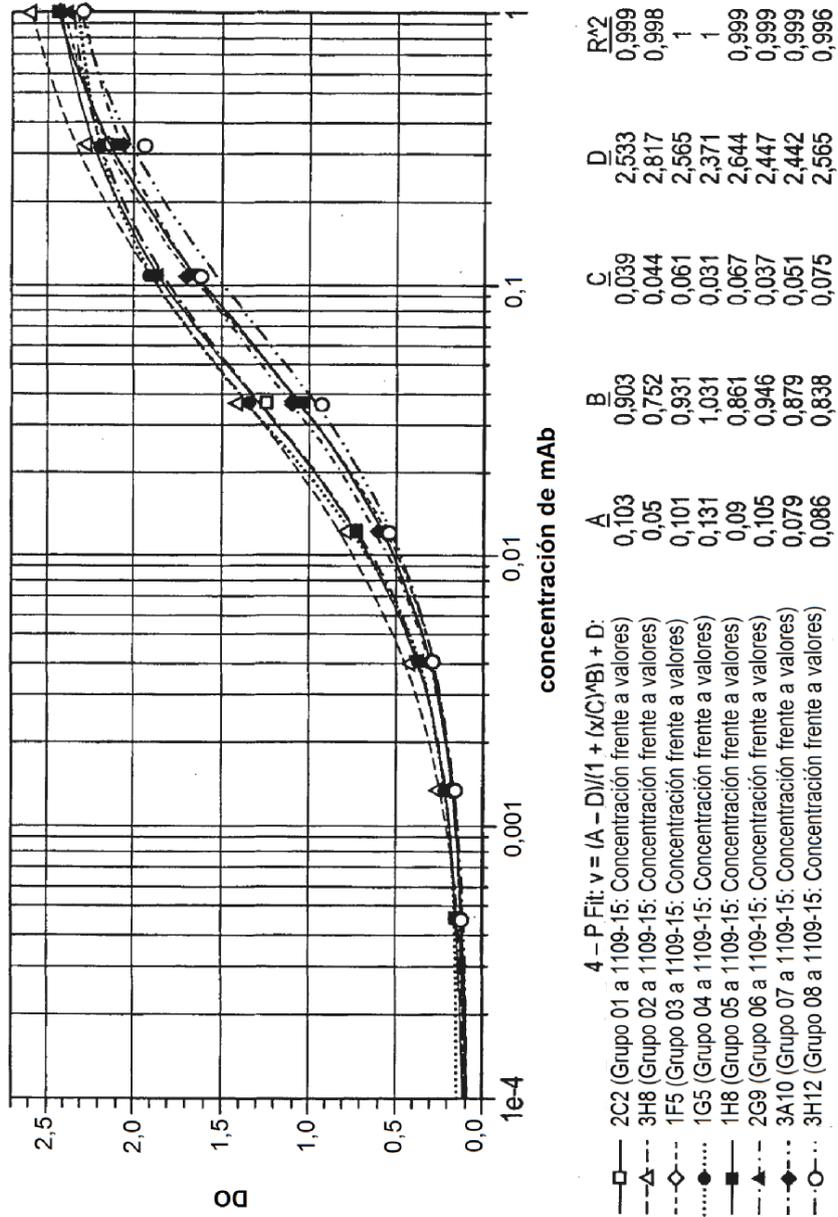
(b) detectar el anticuerpo unido a CD27 para así detectar la presencia o ausencia de CD27 en la muestra biológica.

## Análisis Biacore de mAb para CD27 humana

Clon	Tiempo de disociación (s)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmáx (UR) Fc2-1	Rmáx (UR) Fc4-3	KA (1/M)	KD(M)
1G5	480	2,23E+05	8,98E-05	236	177	2,55E+09	4,02E-10
1H8	480	2,18E+05	3,44E-05	313	226	6,39E+09	1,58E-10
3H12	480	1,74E+05	6,23E-05	298	205	2,80E+09	3,58E-10
3H8	1200	1,12E+05	6,19E-06	126	96	1,81E+10	5,56E-11
2G9	1200	1,74E+05	2,65E-07	97	75	6,60E+11	1,53E-12
1F5	480	3,07E+05	5,72E-05	312	206	5,37E+09	1,86E-10
3A10	480	1,74E+06	3,51E-04	113	79	4,97E+09	2,02E-10
2C2	480	5,03E+05	4,23E-05	54	40	1,20E+10	8,41E-11

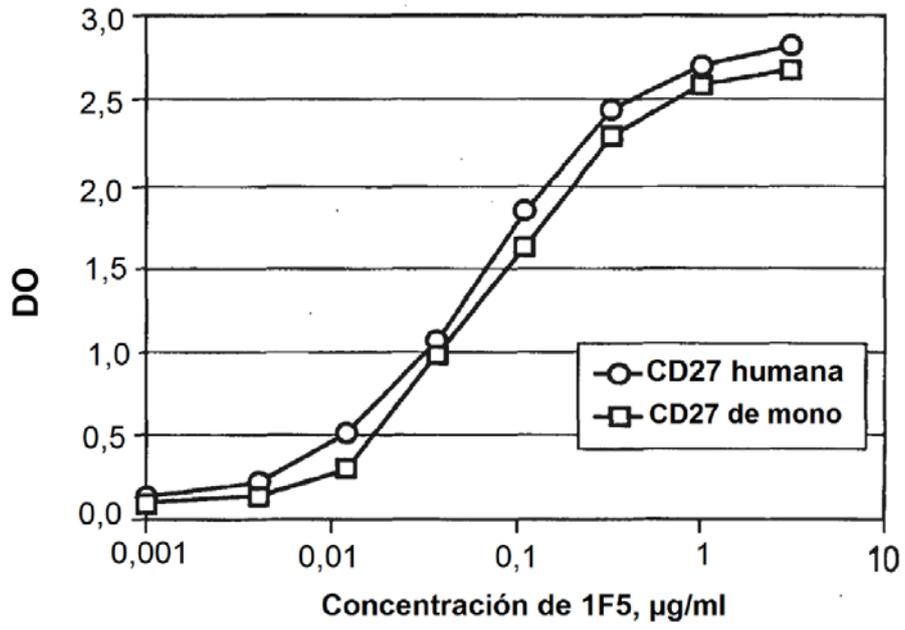
**Fig. 1**

Unión a rCD27-Fc por ELISA  
Gráfico N.º 1

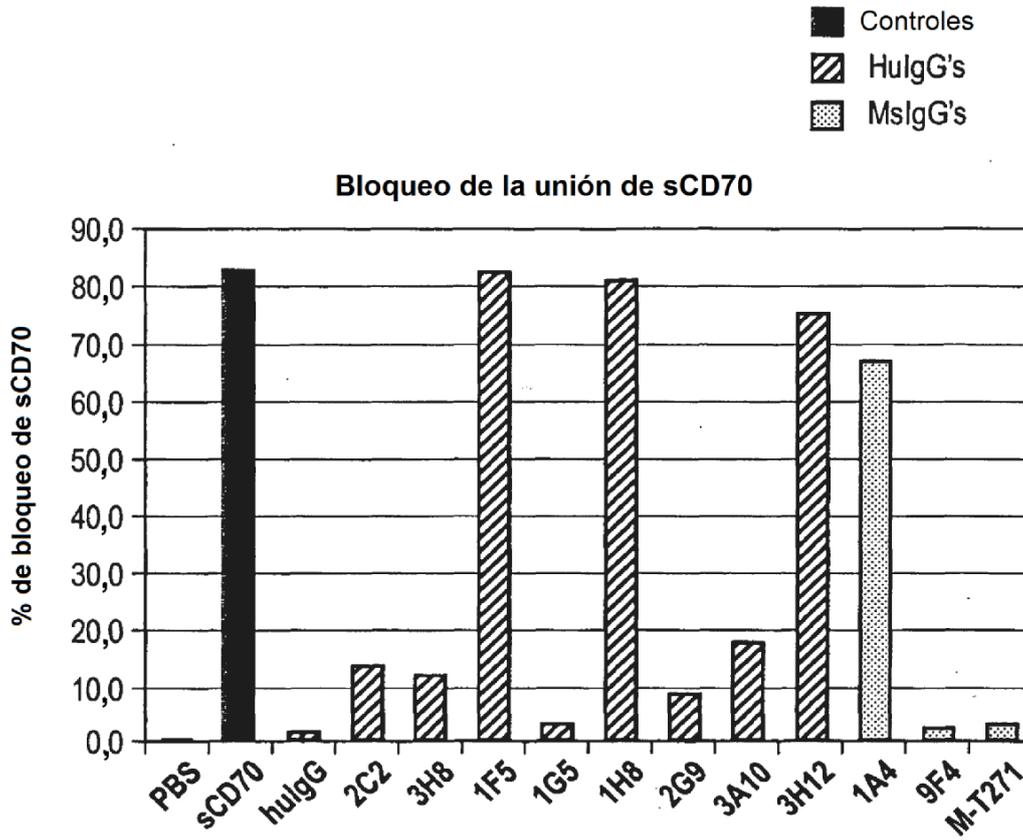


Opción de ajuste de curva – Valor de peso fijo: 1

Fig. 2

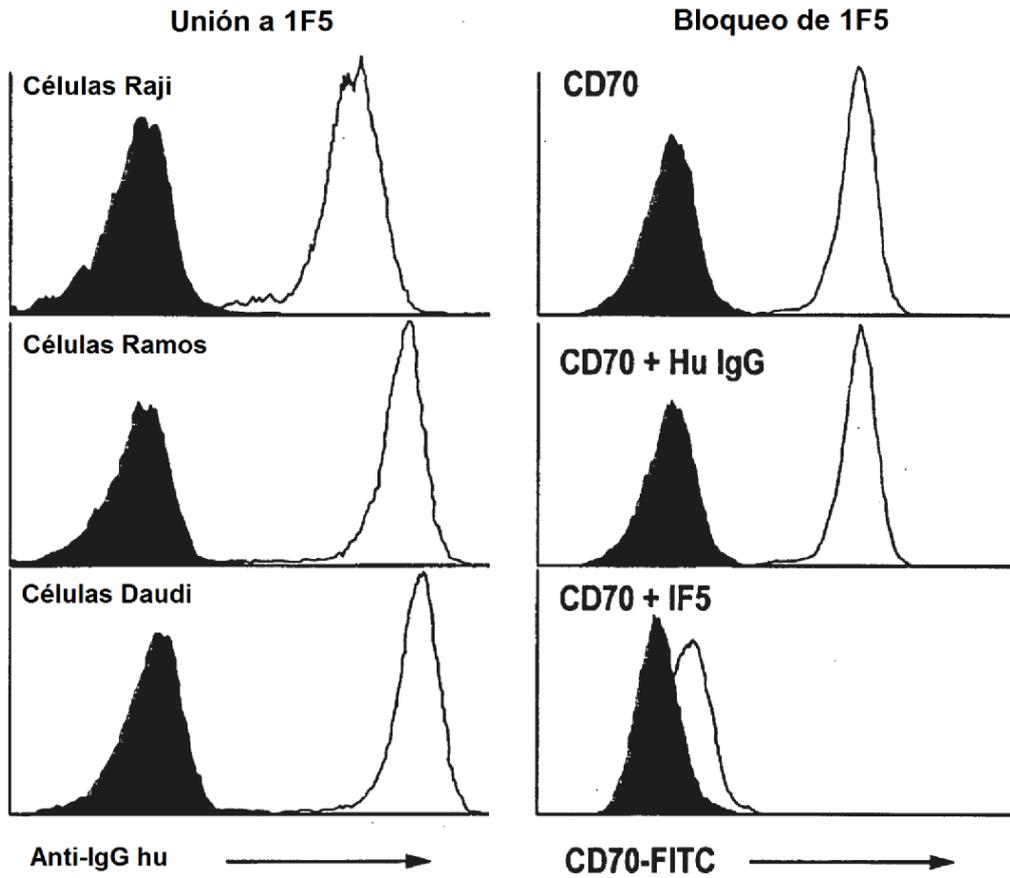


**Fig. 3**

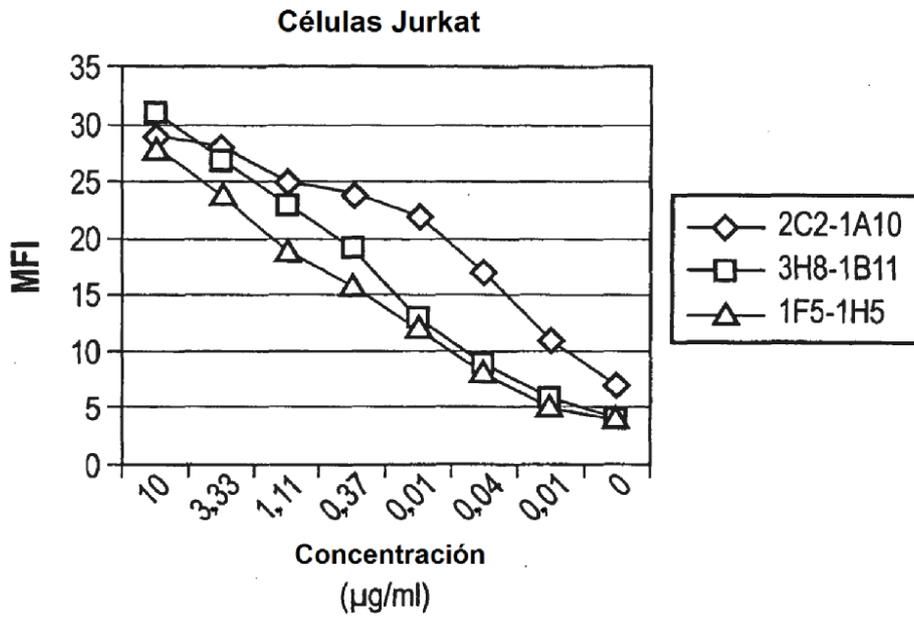


**Fig. 4**

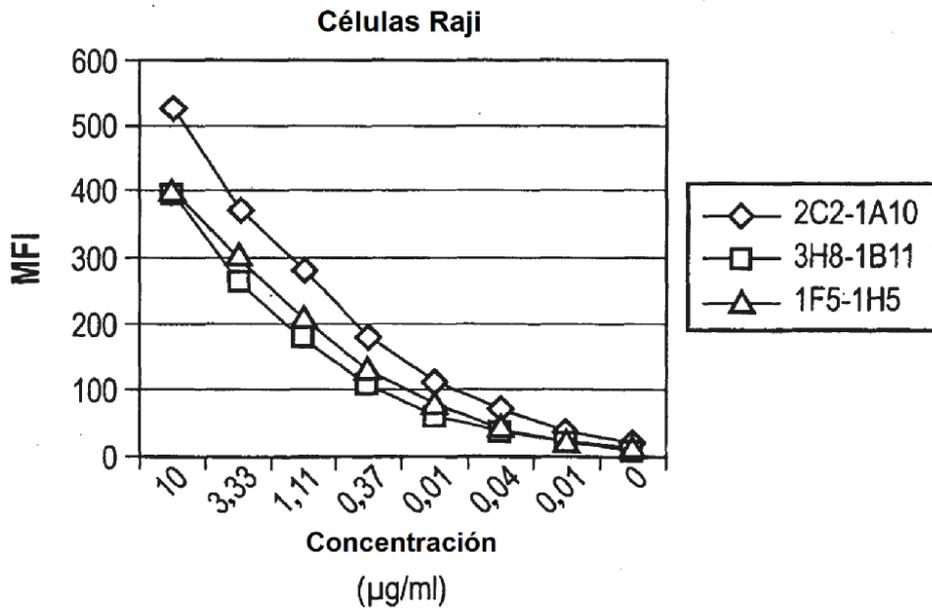
El mAb humano es el principal candidato para desarrollo



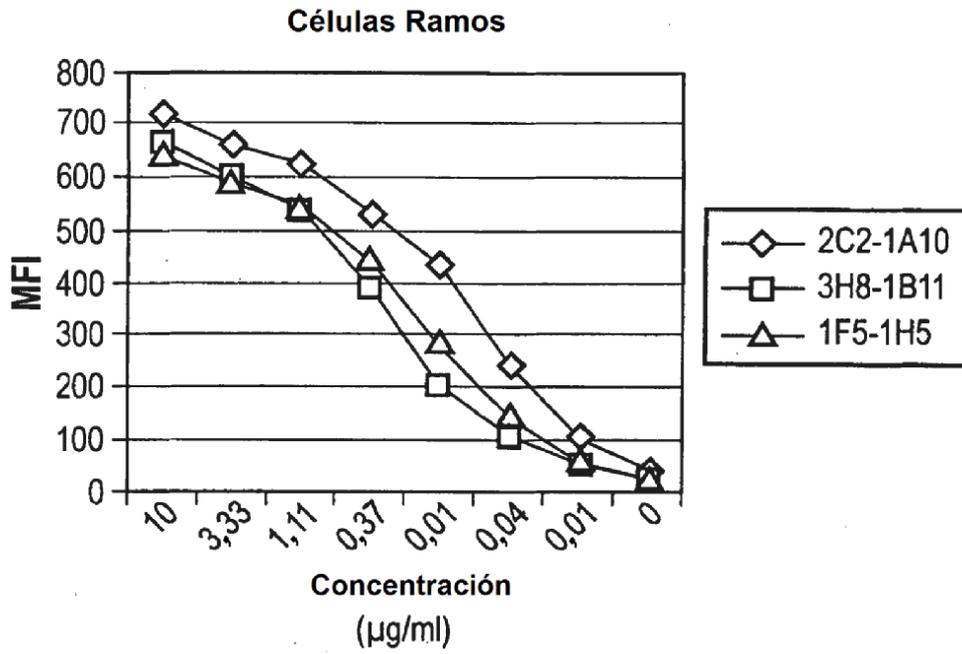
**Fig. 5**



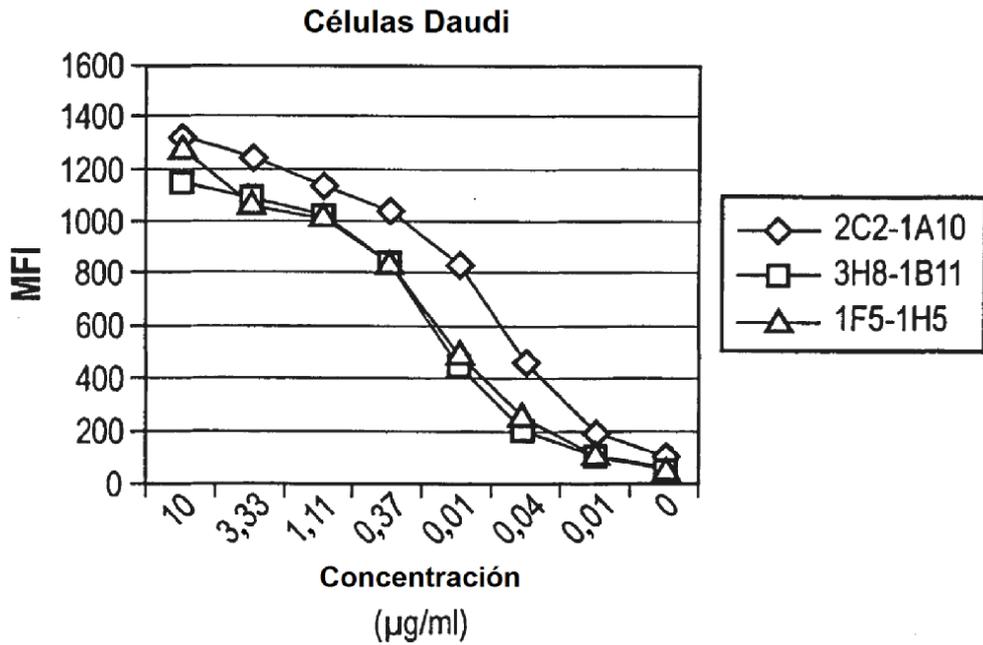
**Fig. 6A**



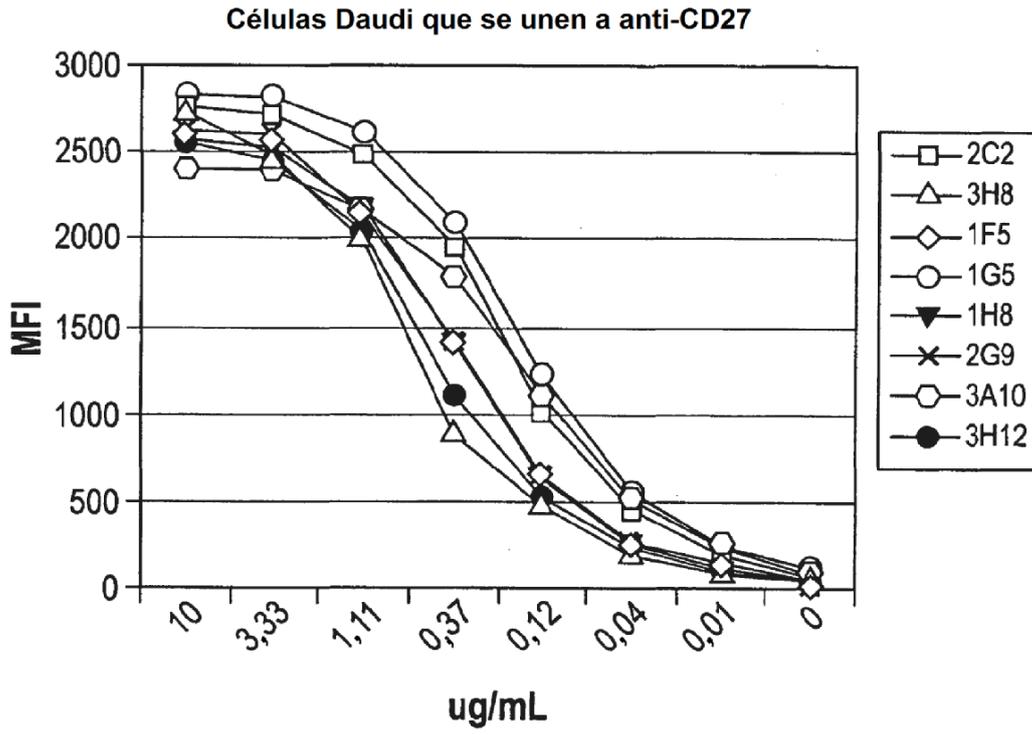
**Fig. 6B**



**Fig. 6C**



**Fig. 6D**



**Fig. 7**

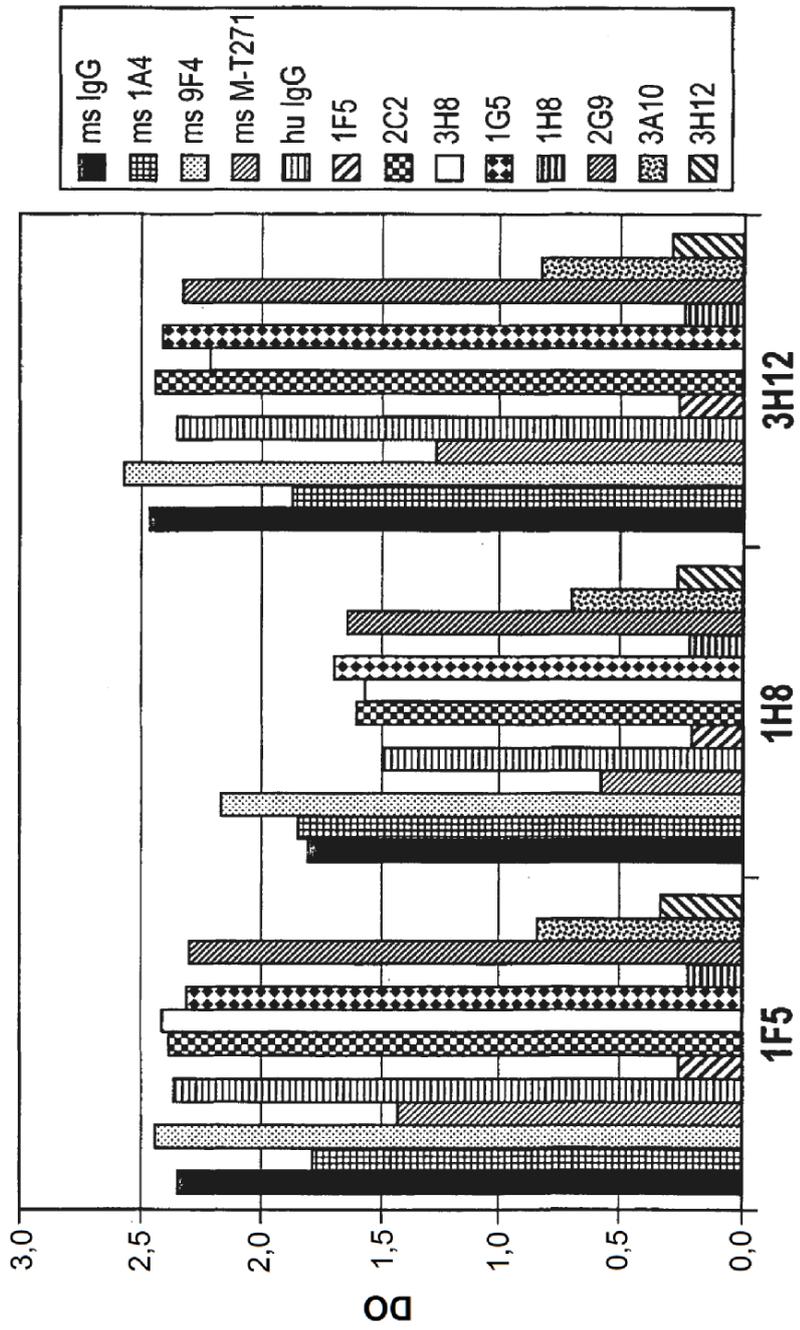


Fig. 8

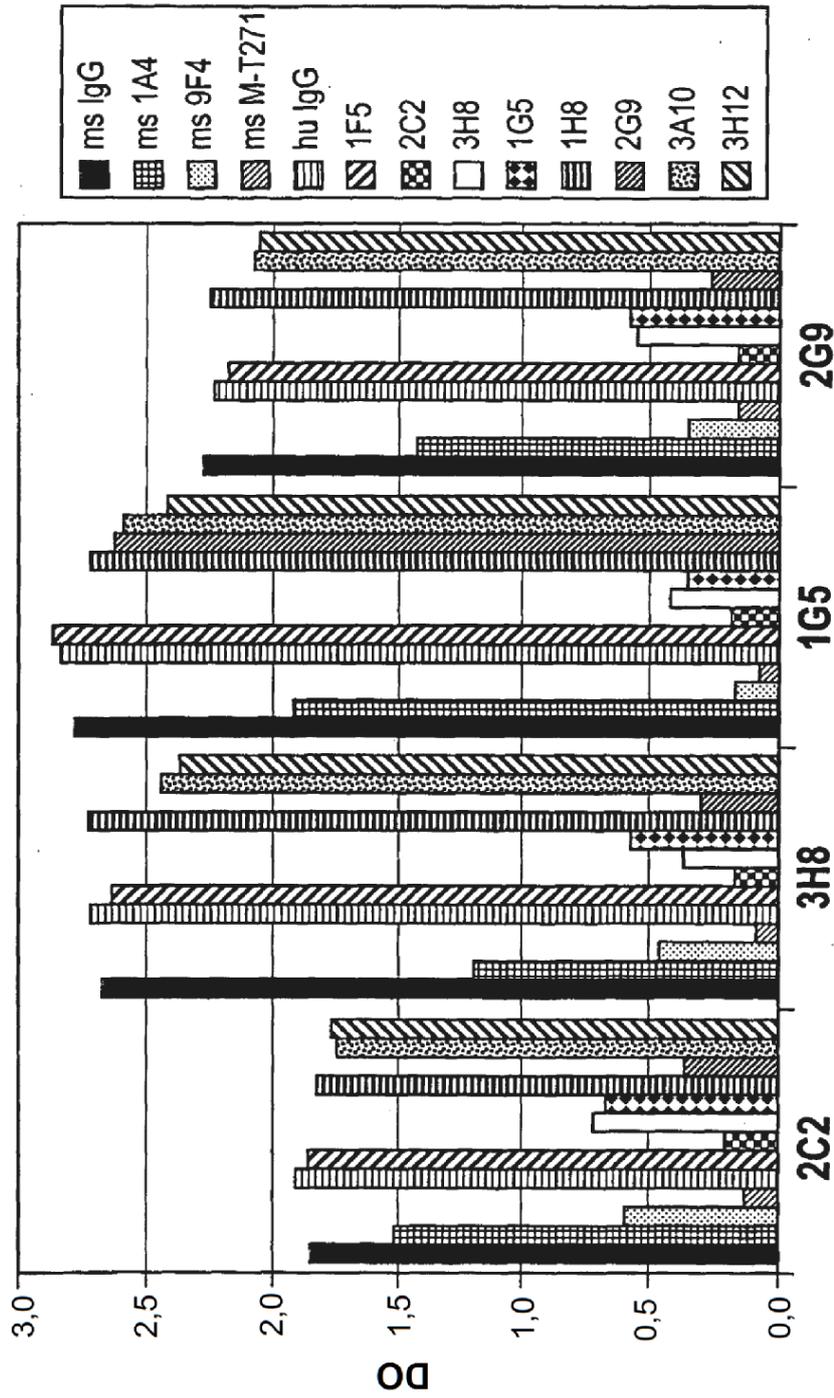
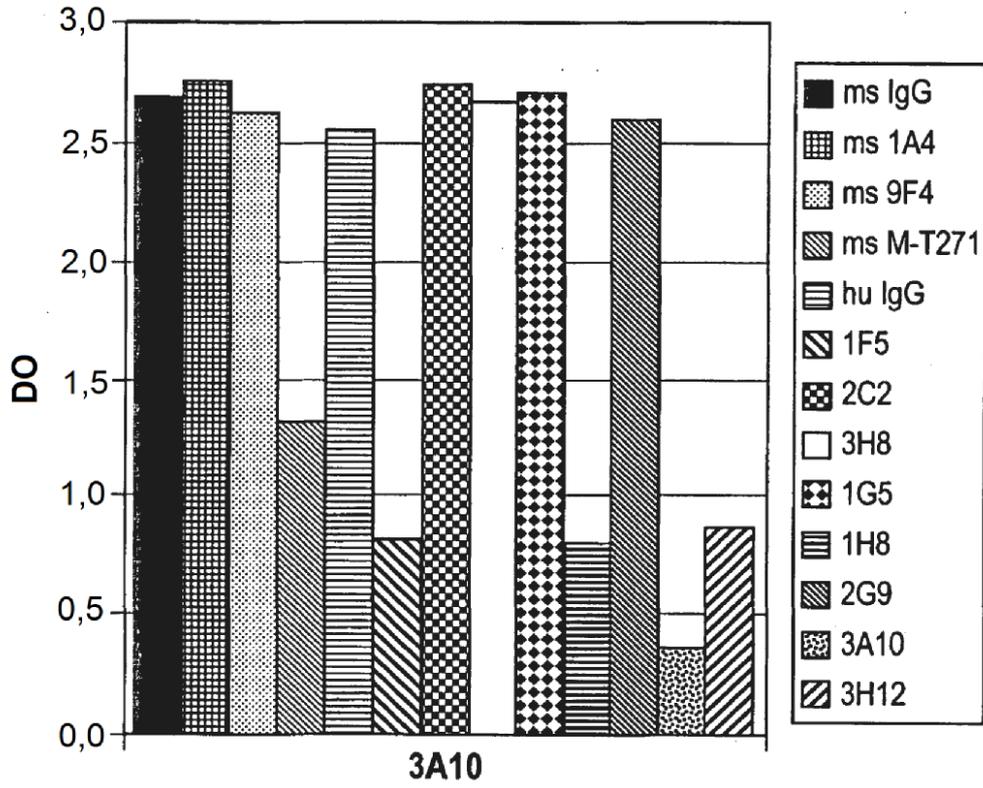
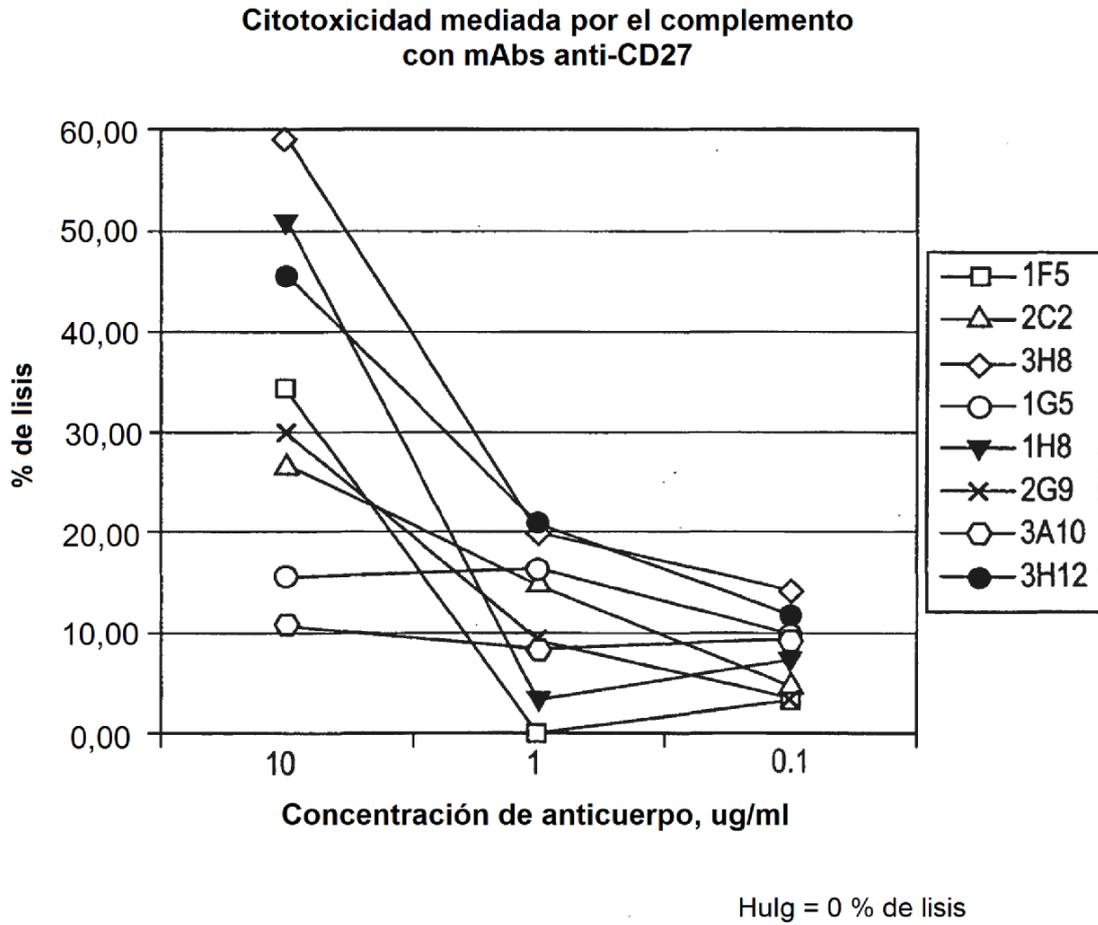


Fig. 9

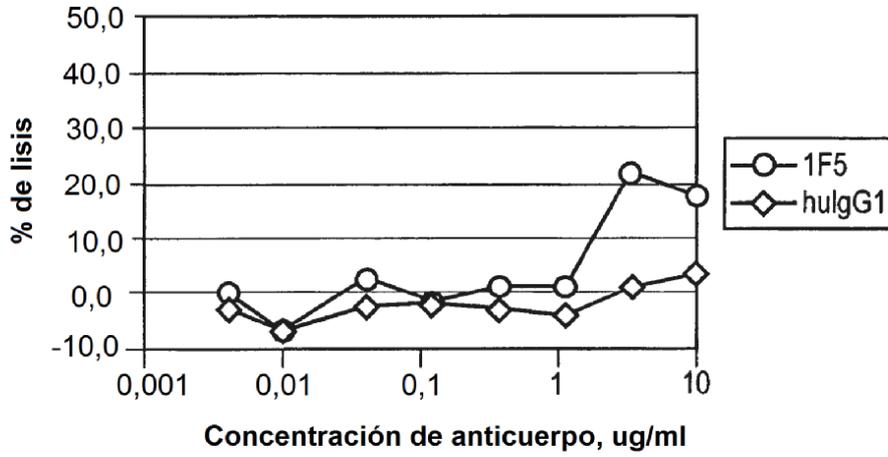


**Fig. 10**



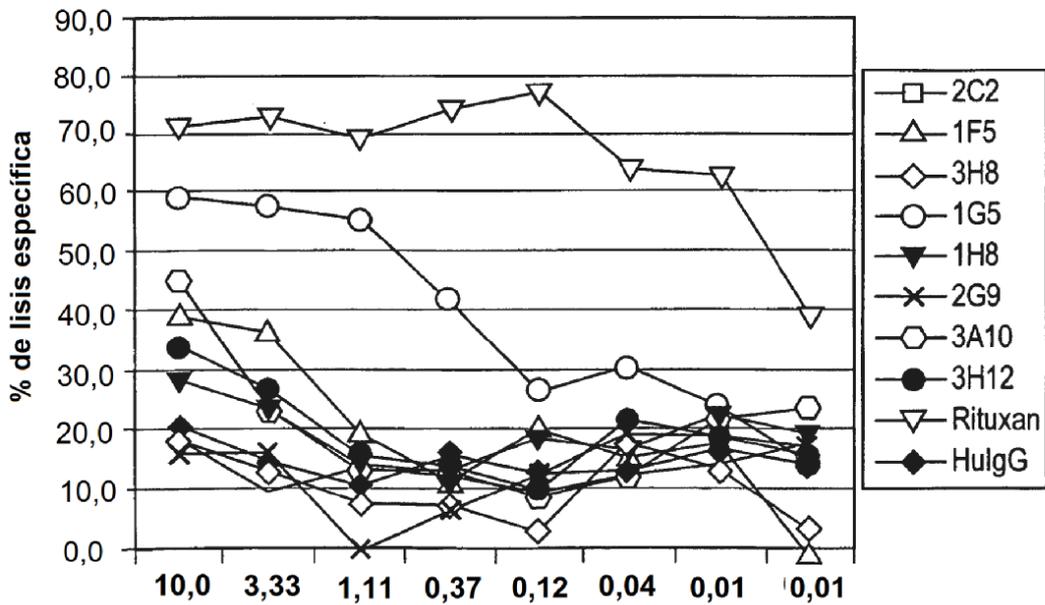
**Fig. 11**

**Citotoxicidad dependiente del complemento  
con células Ramos**



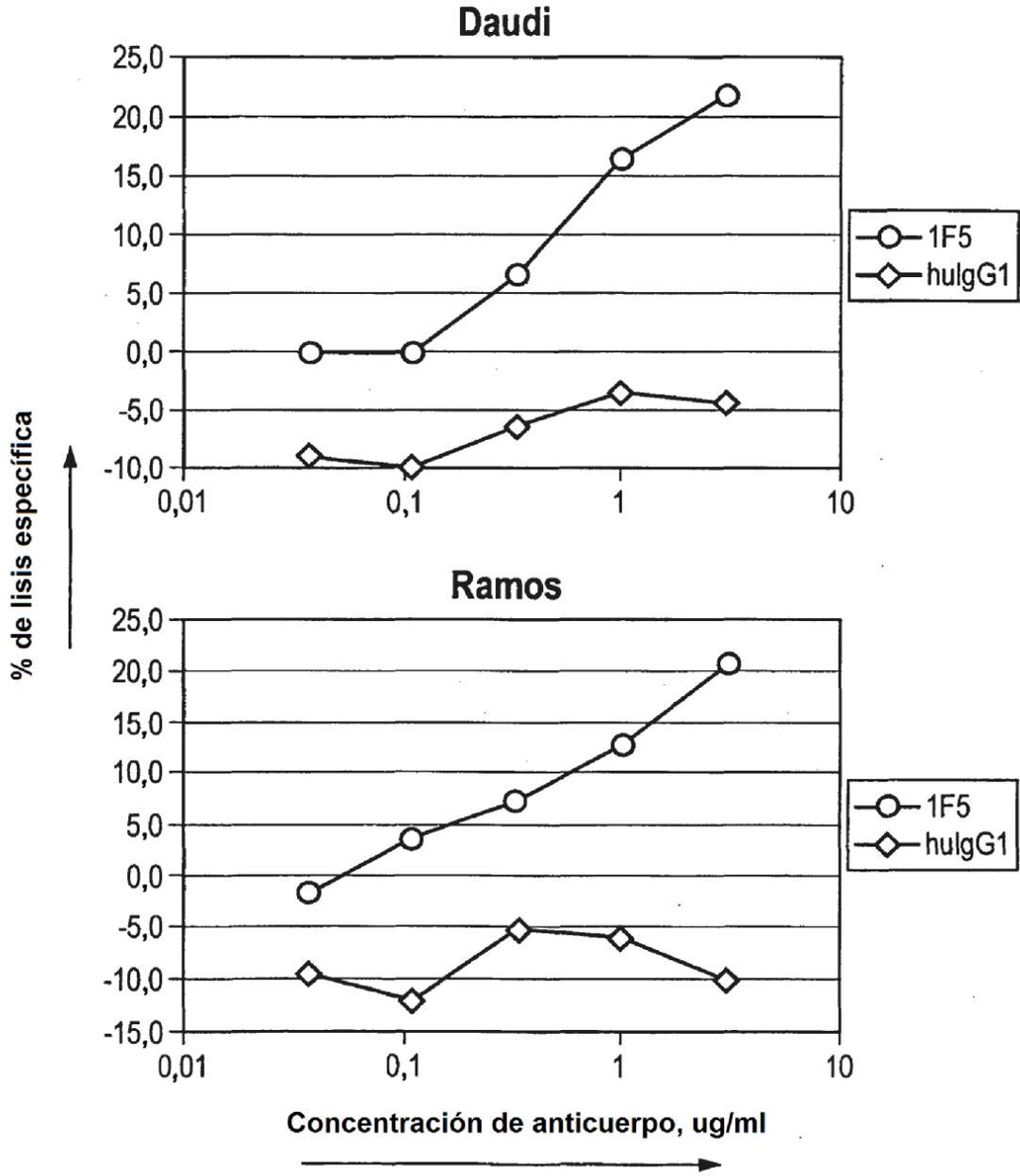
**Fig. 12**

**ADCC de células Raji con células efectoras  
CMSP estimuladas con IL-2**



**Fig. 13**

**ADCC**  
75:1 de E:D



**Fig. 14**

**Alineamiento de VH**

	1		50
1F5-1H5 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS	
1G5-1B9 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFSFSS	
1H8-B4 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNI	
2C2-1A10 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSS	
2G9-1D11 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSS	
3A10-1G10 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSH	
3H12-1E12 V-H	(1)	MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCATS GFTFSS	
3H8-1B11 V-H	(1)	MELGLSWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS	
	51		100
1F5-1H5 V-H	(51)	YDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL	
1G5-1B9 V-H	(51)	YGMHWVRQAPGKGLEWVALLWYDGSNKDFADSVKGRFTISRDN SKNTLDL	
1H8-B4 V-H	(51)	YDMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL	
2C2-1A10 V-H	(51)	YDIHWVRQAPGKGLEWVAIWN DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSTNSLFL	
2G9-1D11 V-H	(51)	HDIHWVRQAPGKGLEWVAIWN DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSTNSLFL	
3A10-1G10 V-H	(51)	YGMHWVRQAPGKPEWVAI I WYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLDL	
3H12-1E12 V-H	(51)	YDMHWVRQAPGKGLEWVAI WYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL	
3H8-1B11 V-H	(51)	YMAWVRQAPGKGLEWLGNIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDN AKNSLYL	
	101		143
1F5-1H5 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYYCARGSGN-----WGFFDYWGQGLTVTSS	
1G5-1B9 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYYCAREGLAVPG--HWYFDLWGRGTLTVTSS	
1H8-B4 V-H	(101)	QMNILRAEDTAVYYCARG-TH-----WGYFDYWGQGLTVTSS	
2C2-1A10 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYYCVGG-----TADLEHWDQGLTVTSS	
2G9-1D11 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYYCVRG-----TADLEHWDQGLTVTSS	
3A10-1G10 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYYCARDGWTTMVRGLNVFDIWGQGMTVTSS	
3H12-1E12 V-H	(101)	QMNSLGD EDTAVYYCARGSGN-----WGFFDYWGQGLTVTSS	
3H8-1B11 V-H	(101)	QMNSLRAEDTAVYYCVRELG-----MDWYFDLWGRGTLTVTSS	

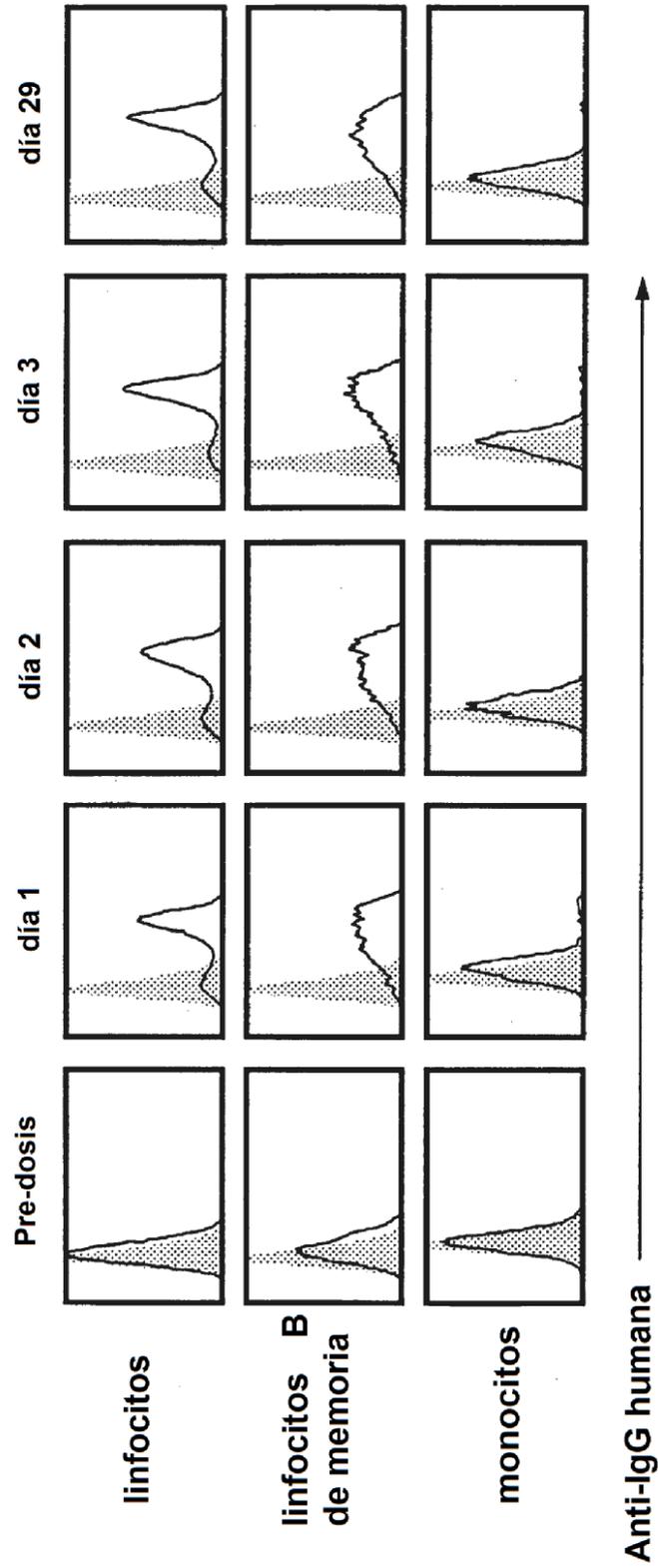
**Fig. 15**

**Alineamiento de VK**

	1	50
1F5-1H5 V-L #2	(1) MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
1G5-1B9 V-L	(1) MRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
1H8-B4 V-L	(1) MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
2C2-1A10 V-L	(1) MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
2G9-1D11 V-L	(1) MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
3A10-1G10 V-L #2	(1) MRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
3H12-1E12 V-L #2	(1) MRVLAQLLGLLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIS	
3H8-1B11 V-L #2	(1) MEAPAQLLFLLLLWLPDPTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV	
	51	100
1F5-1H5 V-L #2	(51) RWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
1G5-1B9 V-L	(51) SALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
1H8-B4 V-L	(51) SWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASNLSQGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
2C2-1A10 V-L	(51) SWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
2G9 1D11 V-L	(51) SWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
3A10-1G10 V-L #2	(51) SALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
3H12-1E12 V-L #2	(51) RWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP	
3H8-1B11 V-L #2	(51) SYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISNLEP	
	101	127
1F5-1H5 V-L #2	(101) EDFATYYCQQYNTYPRTFGGQTKVEIK	
1G5-1B9 V-L	(101) EDFATYYCQQFNTYPRTFGGQTKVEIK	
1H8-B4 V-L	(101) EDFATYYCQQYNSYPRTFGGQTKVEIK	
2C2-1A10 V-L	(101) EDFATYYCQQYNSYPLTFGGGQTKVEIK	
2G9 1D11 V-L	(101) EDFATYYCQQYNSYPLTFGGGQTKVEIK	
3A10-1G10 V-L #2	(101) EDFATYYCQQFNSYPFTFGPGTKVDIK	
3H12-1E12 V-L #2	(101) EDFATYYCQQYNTYPRTFGGQTKVEIK	
3H8-1B11 V-L #2	(101) EDFAVYYCQQRSNWPPTFGGQTKVEIK	

**Fig. 16**

1F5 sobre linfocitos circulantes después de 1 dosis única de 1 mg/kg



**Fig. 17**

1F5 no agota significativamente linfocitos circulantes después de una dosis única de 1 - 10 mg/kg

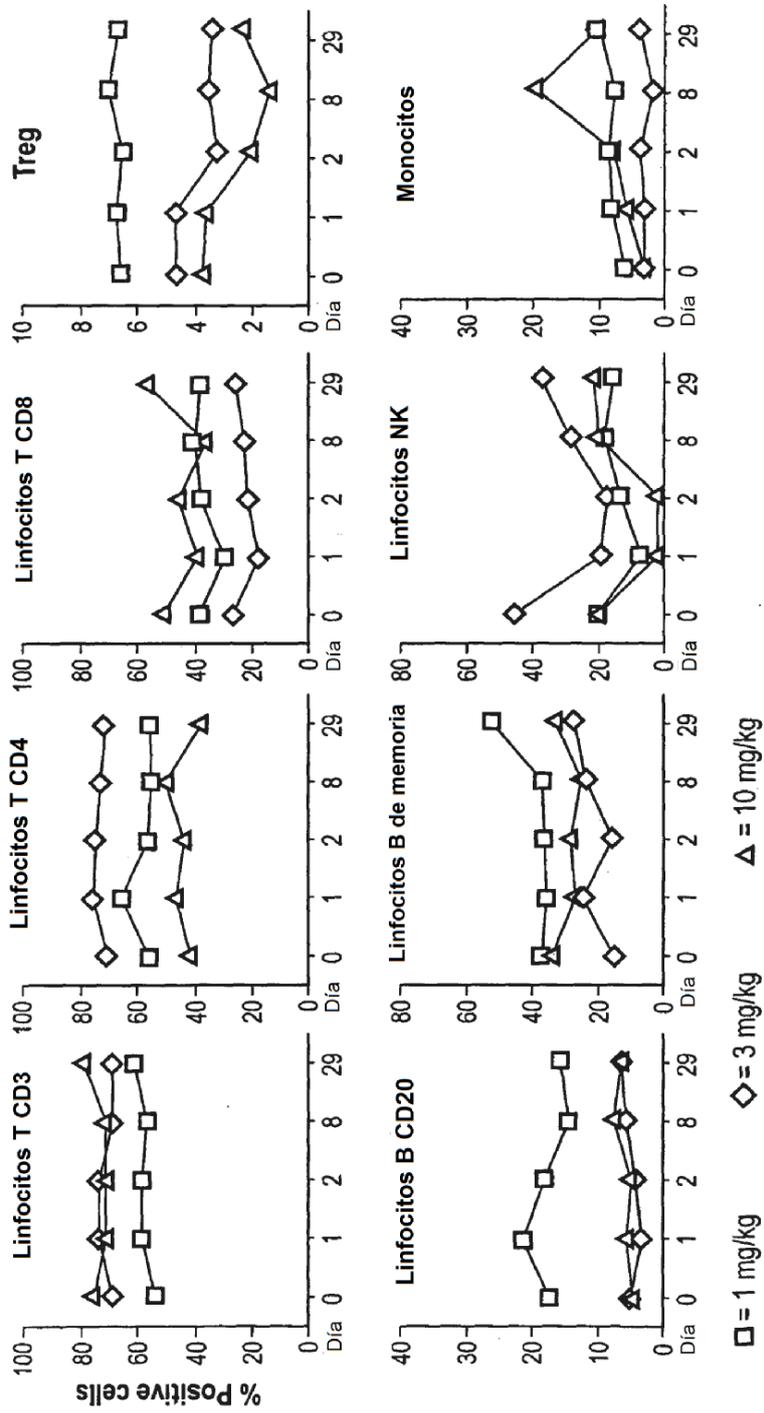
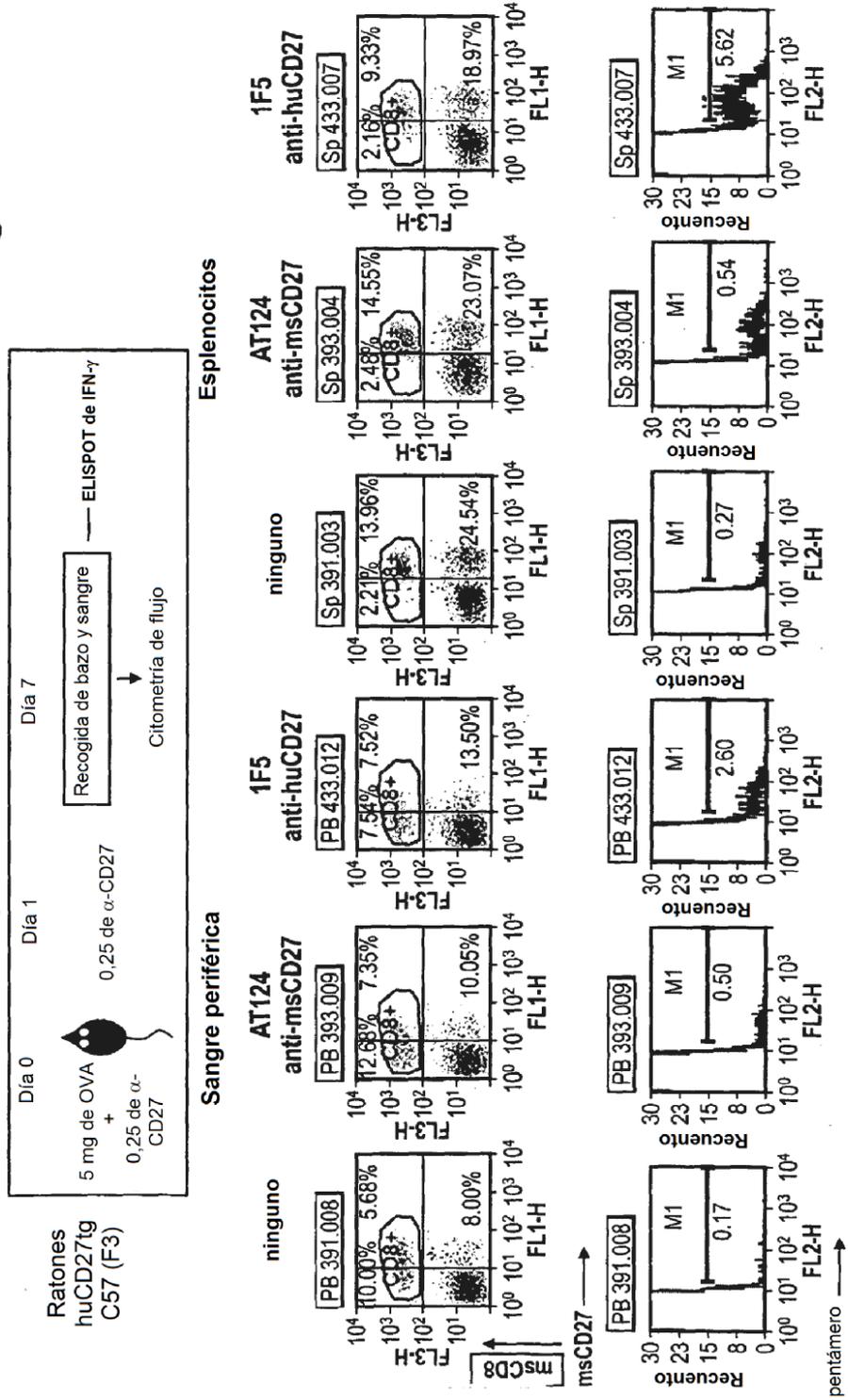


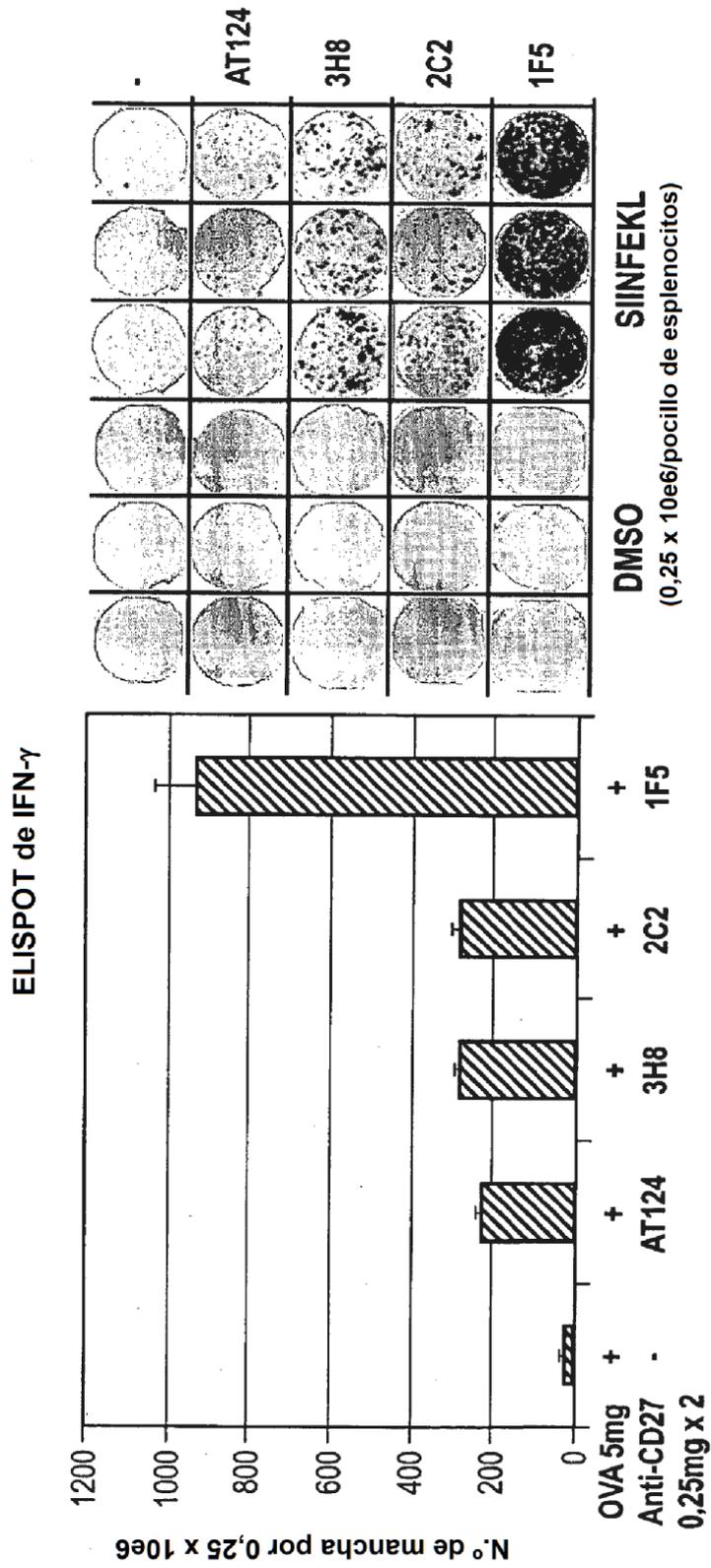
Fig. 18

**Fig. 19**

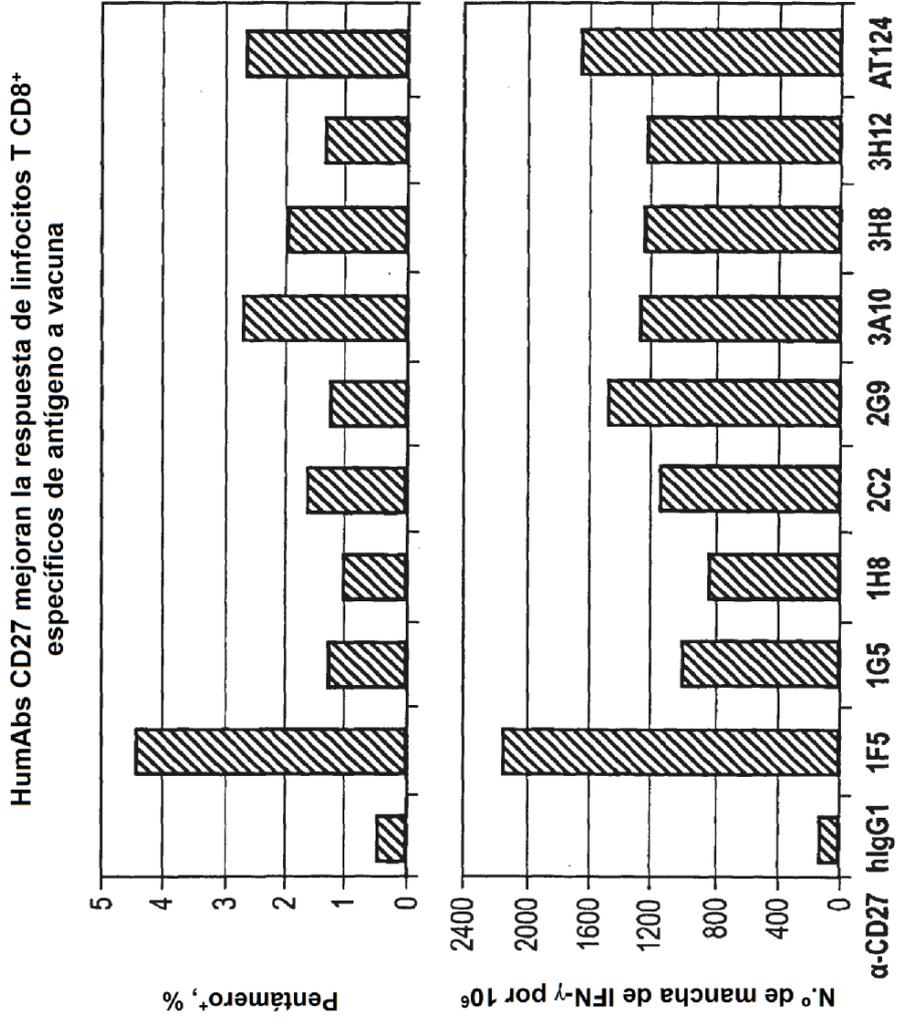
**Tinción de pentámeros H-2K<sup>b</sup>/SINFEKL mejorada con anticuerpos anti-CD27**



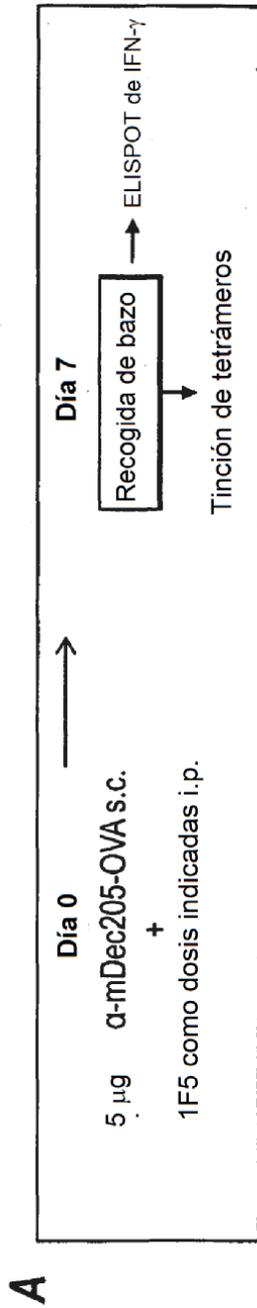
Linfocitos T productores de IFN- $\gamma$   
mejorados con anticuerpos anti-CD27



**Fig. 20**



**Fig. 21**

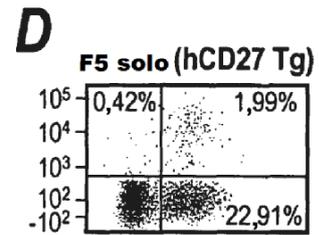
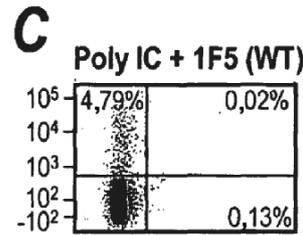
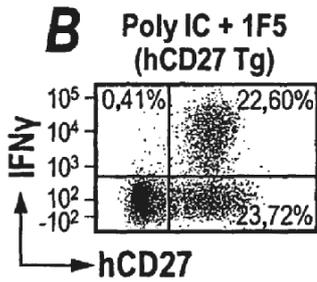
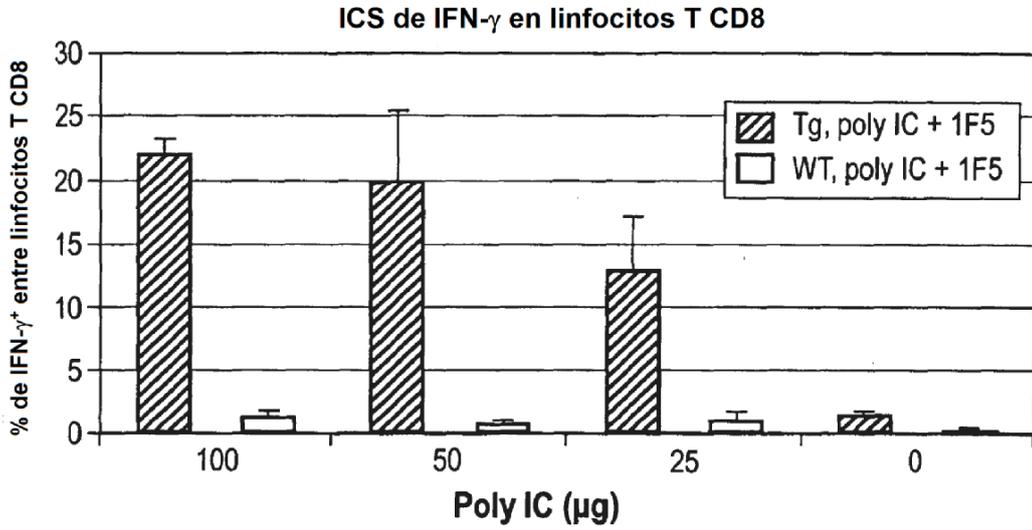


Linfocitos T específicos de OVA medidos por:



**Fig. 22**

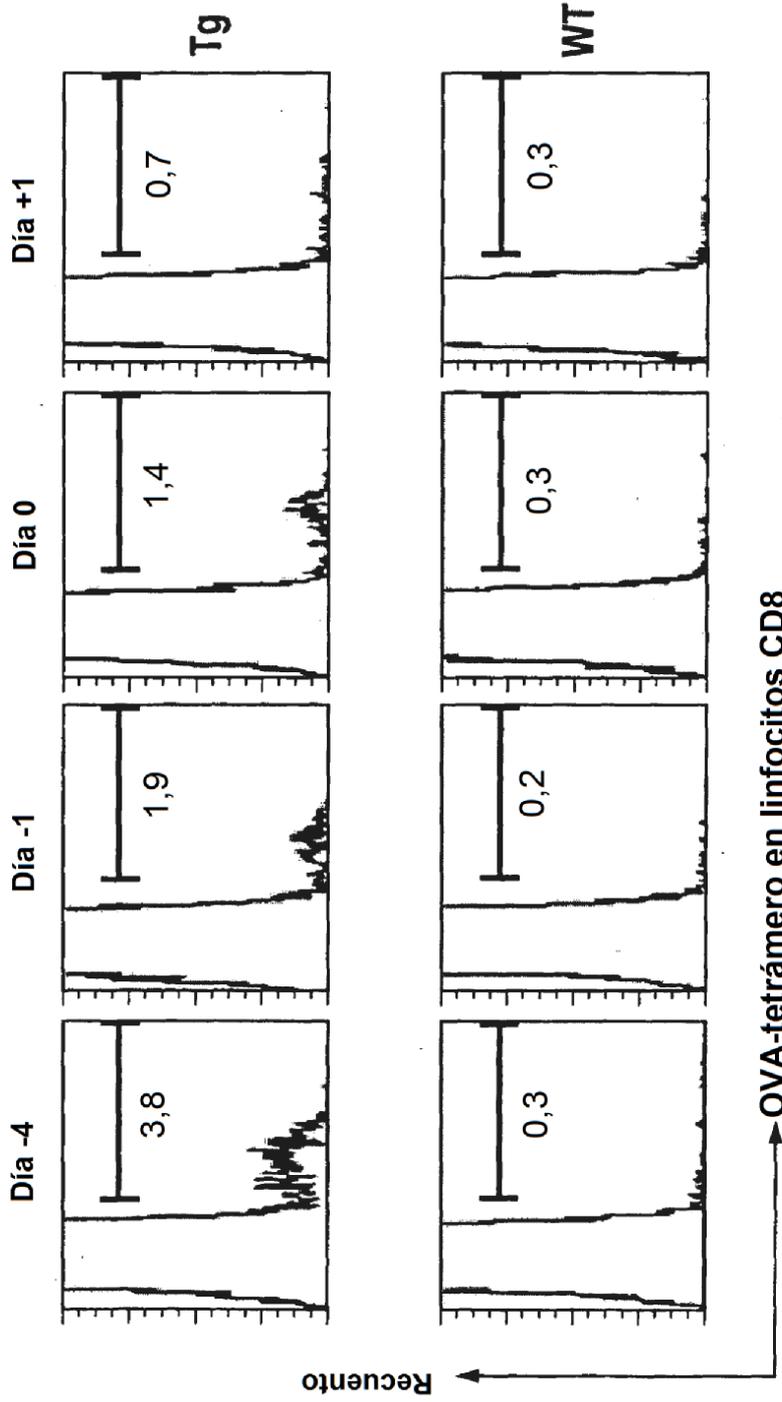
**A** Efecto sinérgico de  $\alpha$ -CD27 y Poly IC sobre las respuestas de linfocitos T a vacuna ( $\alpha$ -DEC205-OVA)



**Fig. 23**

Momento de administración de  $\alpha$ -CD27 con vacuna en la activación de linfocitos T

Dosificación de 1F5 con respecto a vacuna:



**Fig. 24**

Momento de administración de  $\alpha$ -CD27 con vacuna en la activación de linfocitos T (en combinación con Poly IC)

Dosificación de 1F5 con respecto a vacuna:

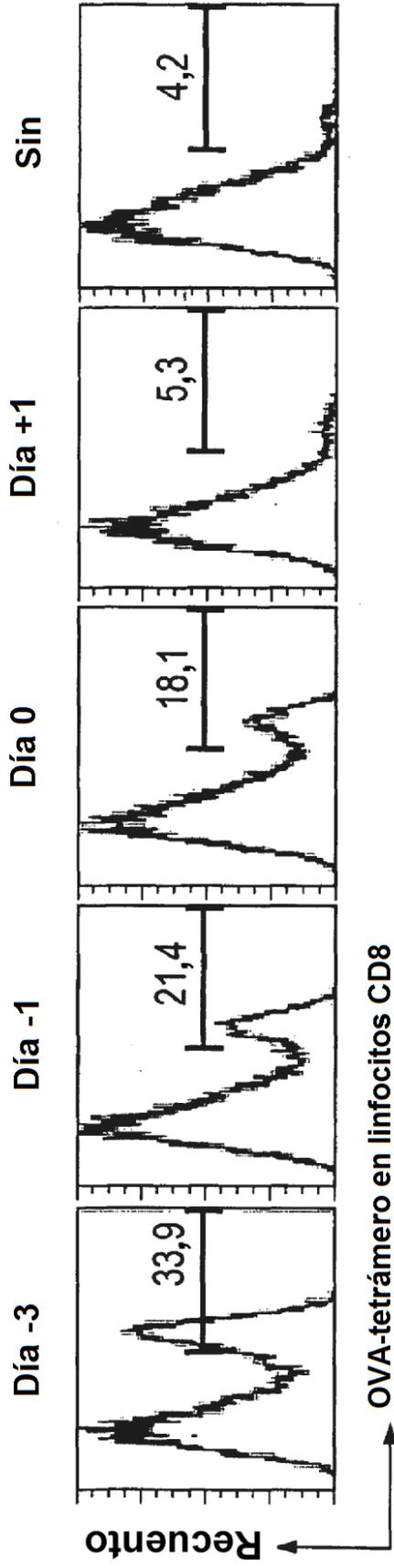
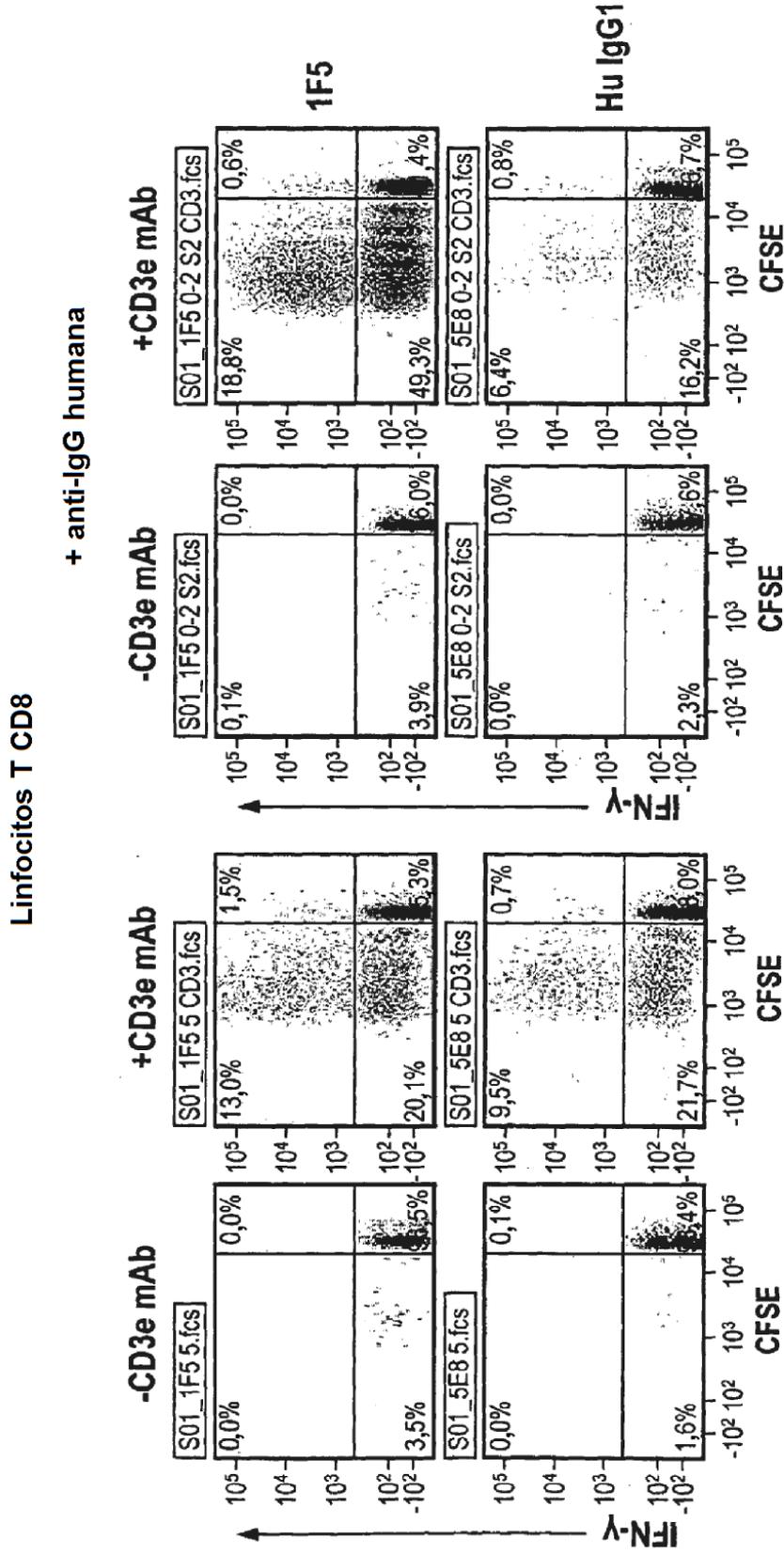


Fig. 25

**1F5 combinado con la activación de TCR induce la proliferación y producción de citocina a partir de linfocitos T in vitro**



**Fig. 26**

1F5 combinado con la activación de TCR induce la proliferación y producción de citocina a partir de linfocitos T *in vitro*

Linfocitos T CD4

+ anti-IgG humana

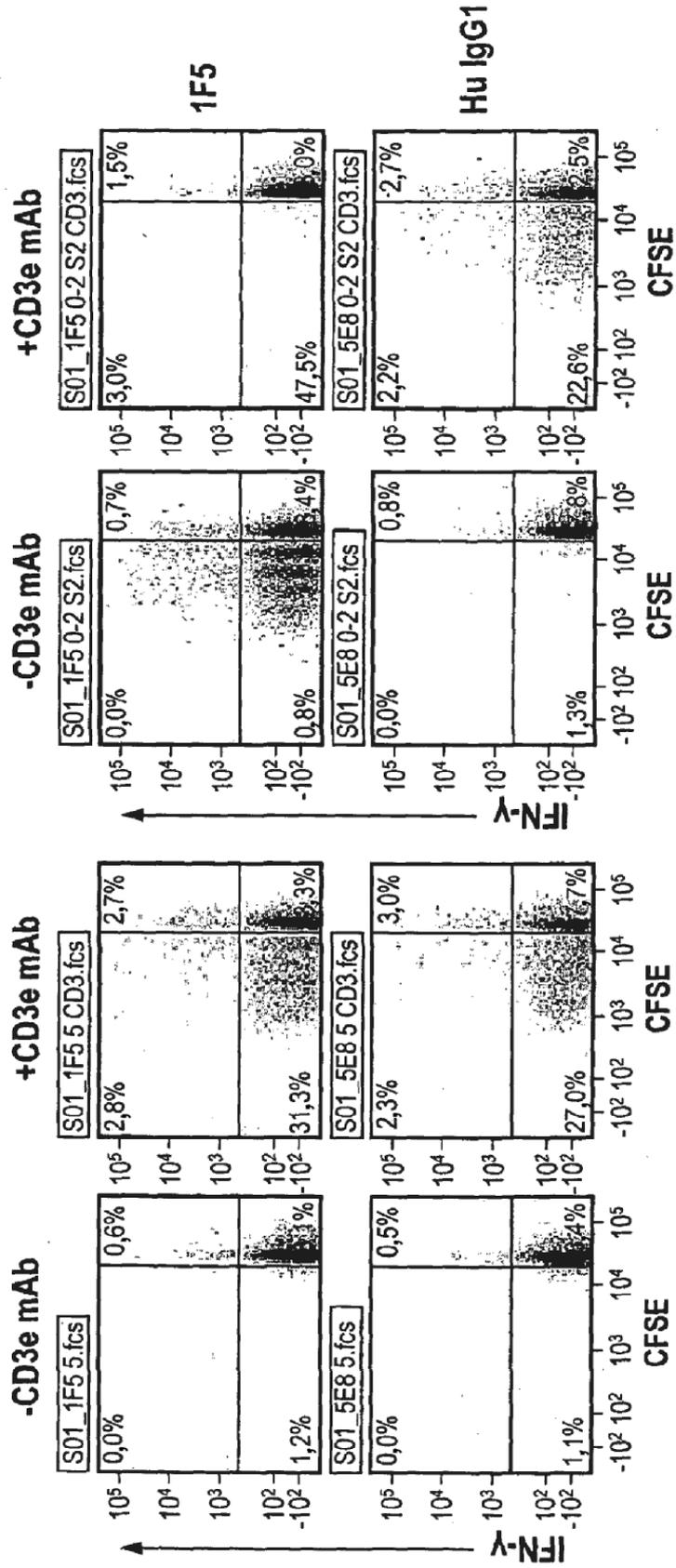
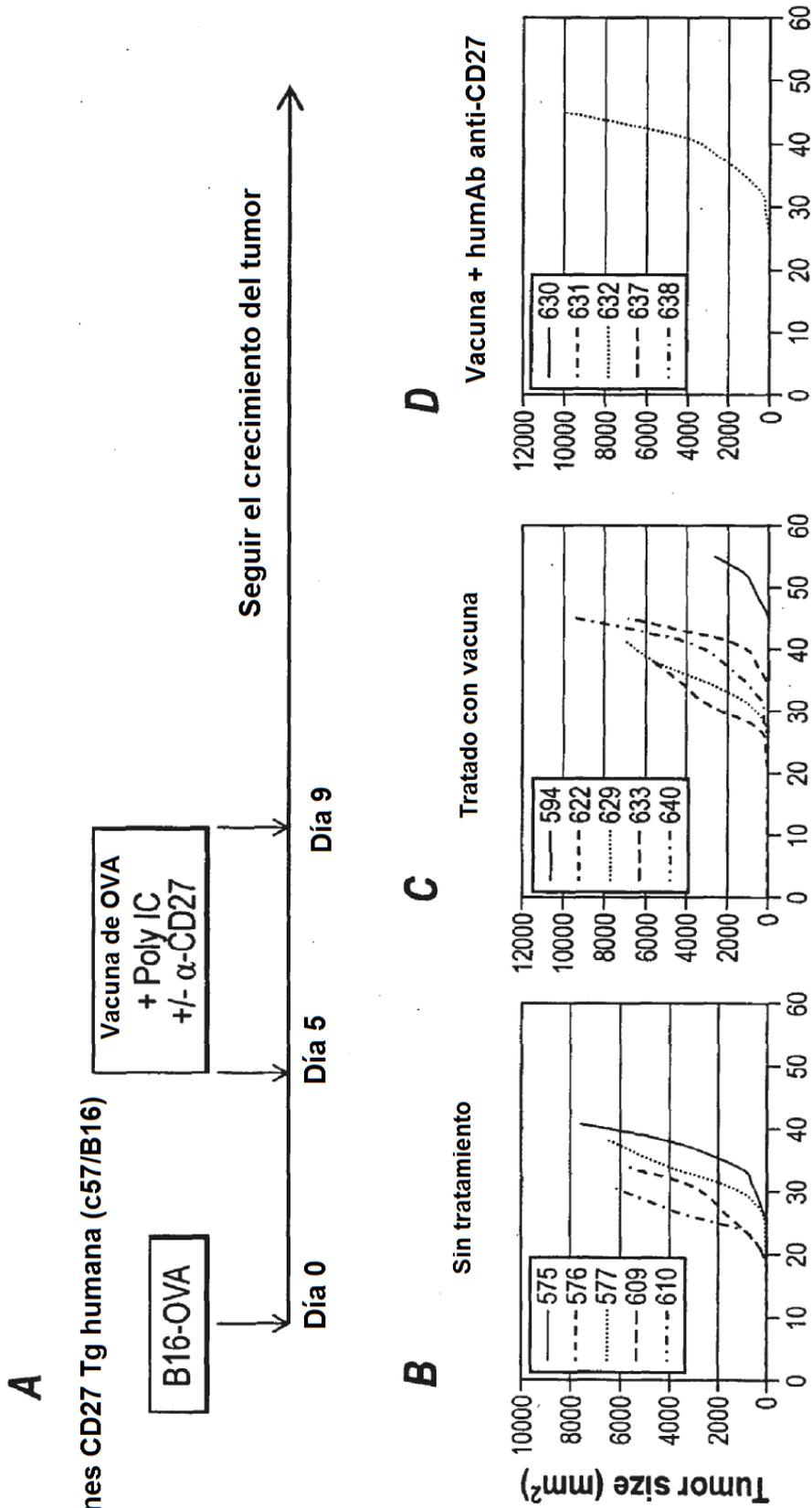
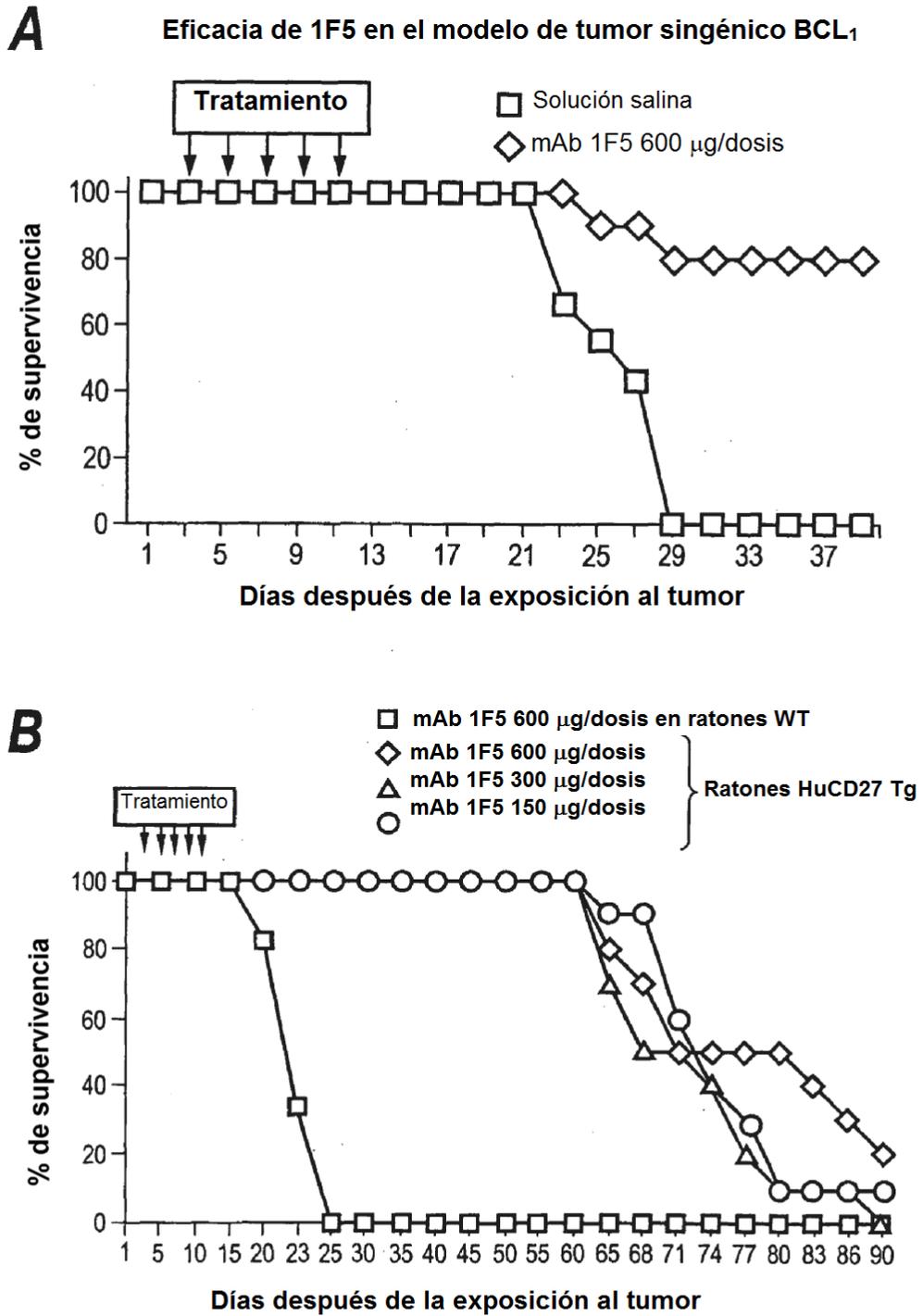


Fig. 27

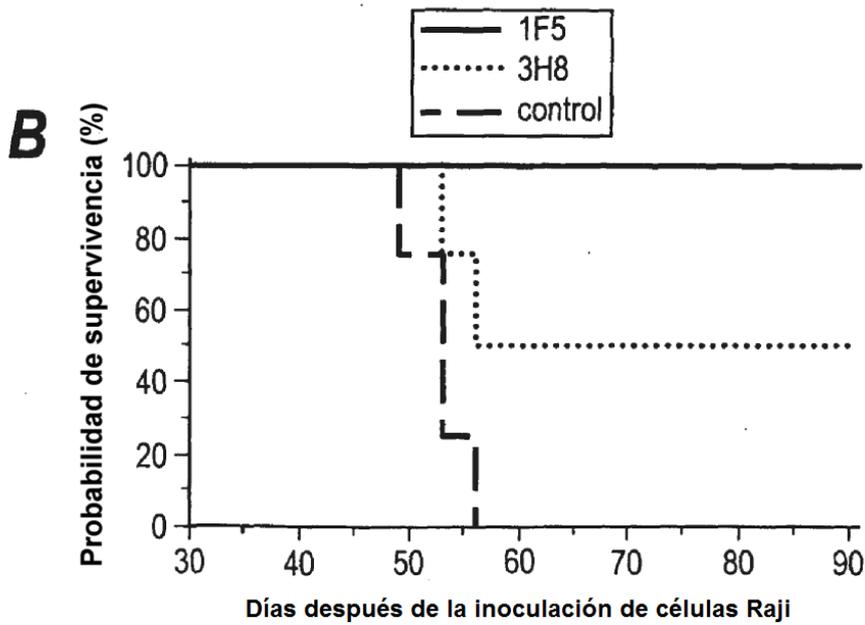
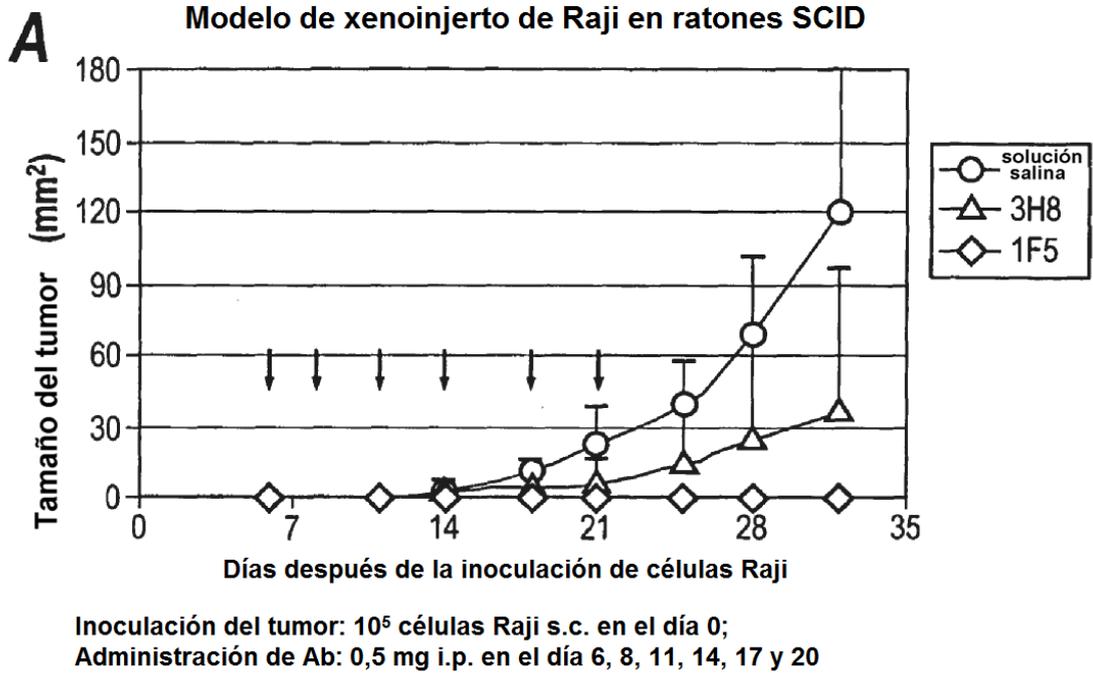


Días después de la inoculación del tumor

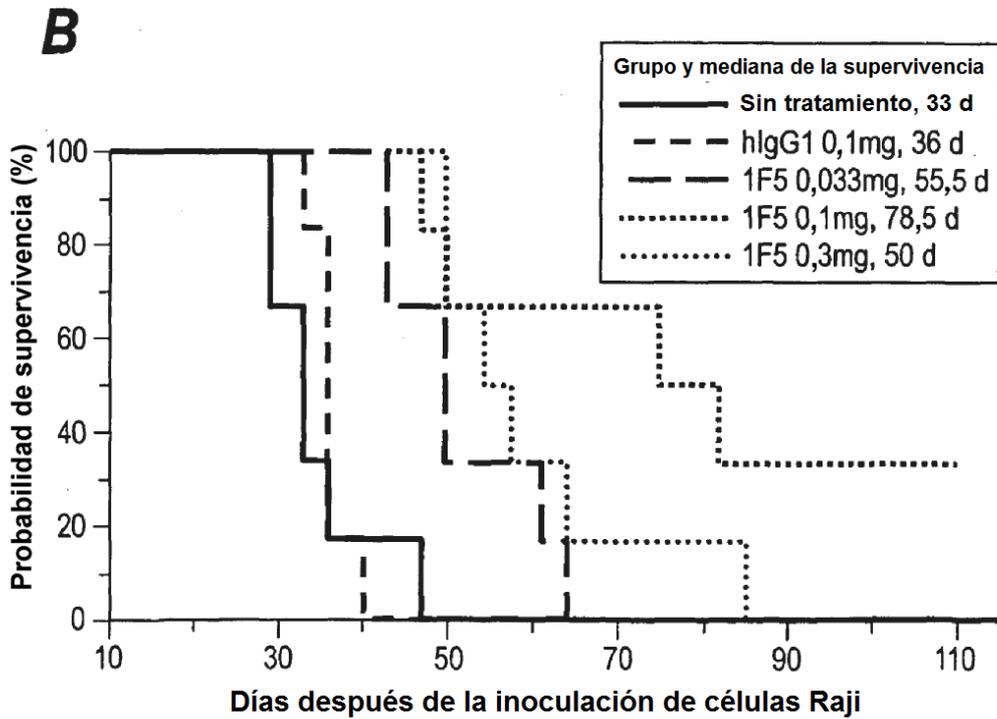
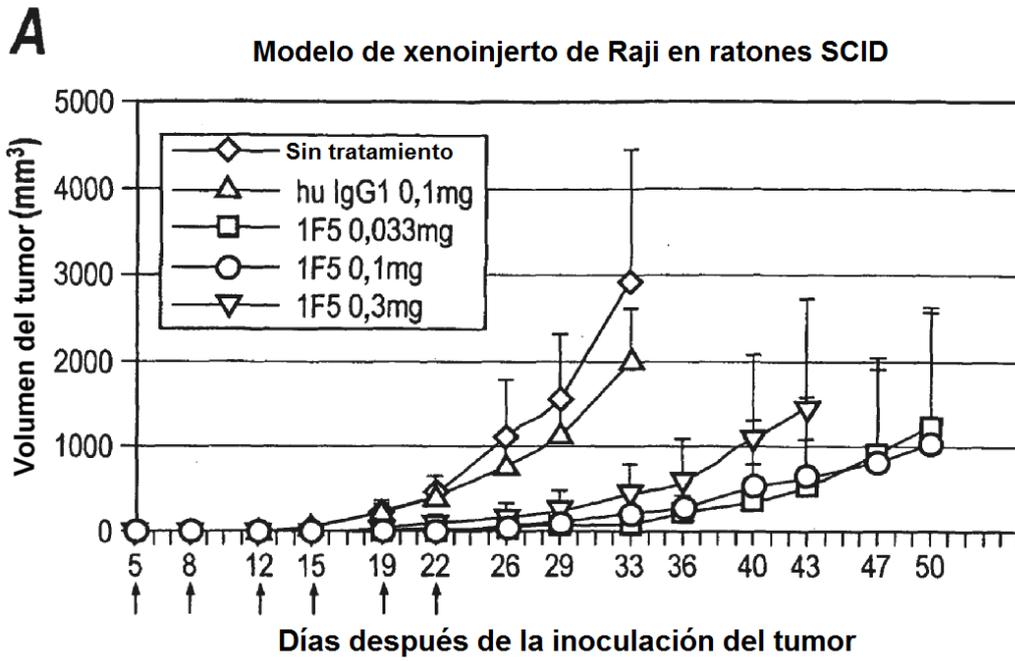
**Fig. 28**



**Fig. 29**

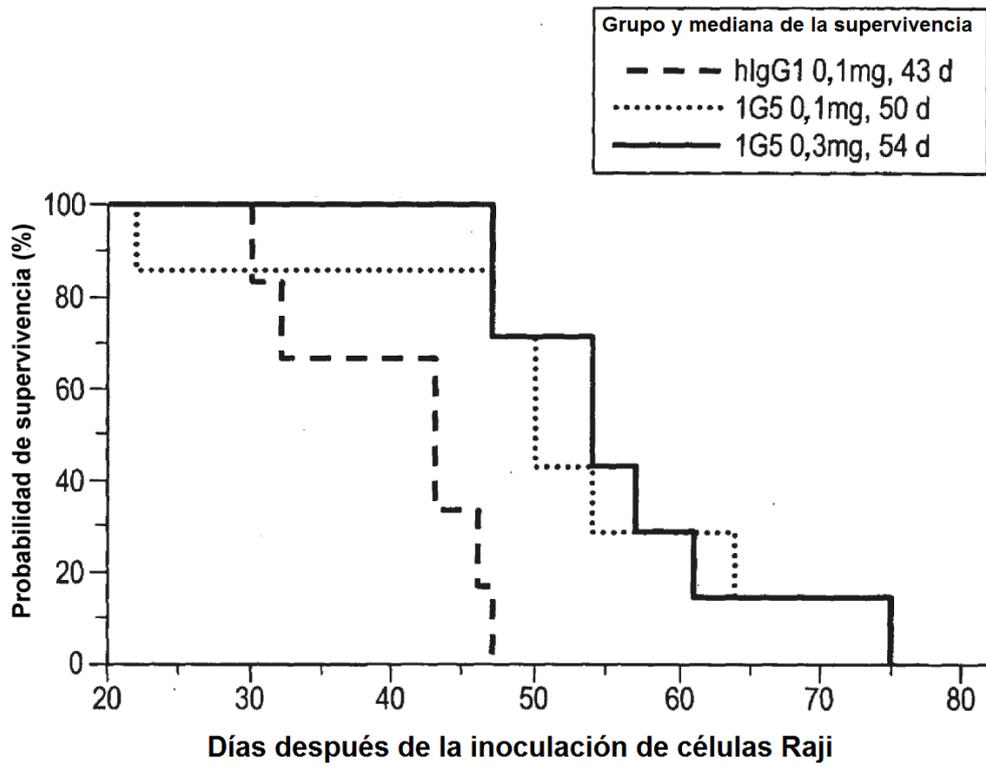


**Fig. 30**

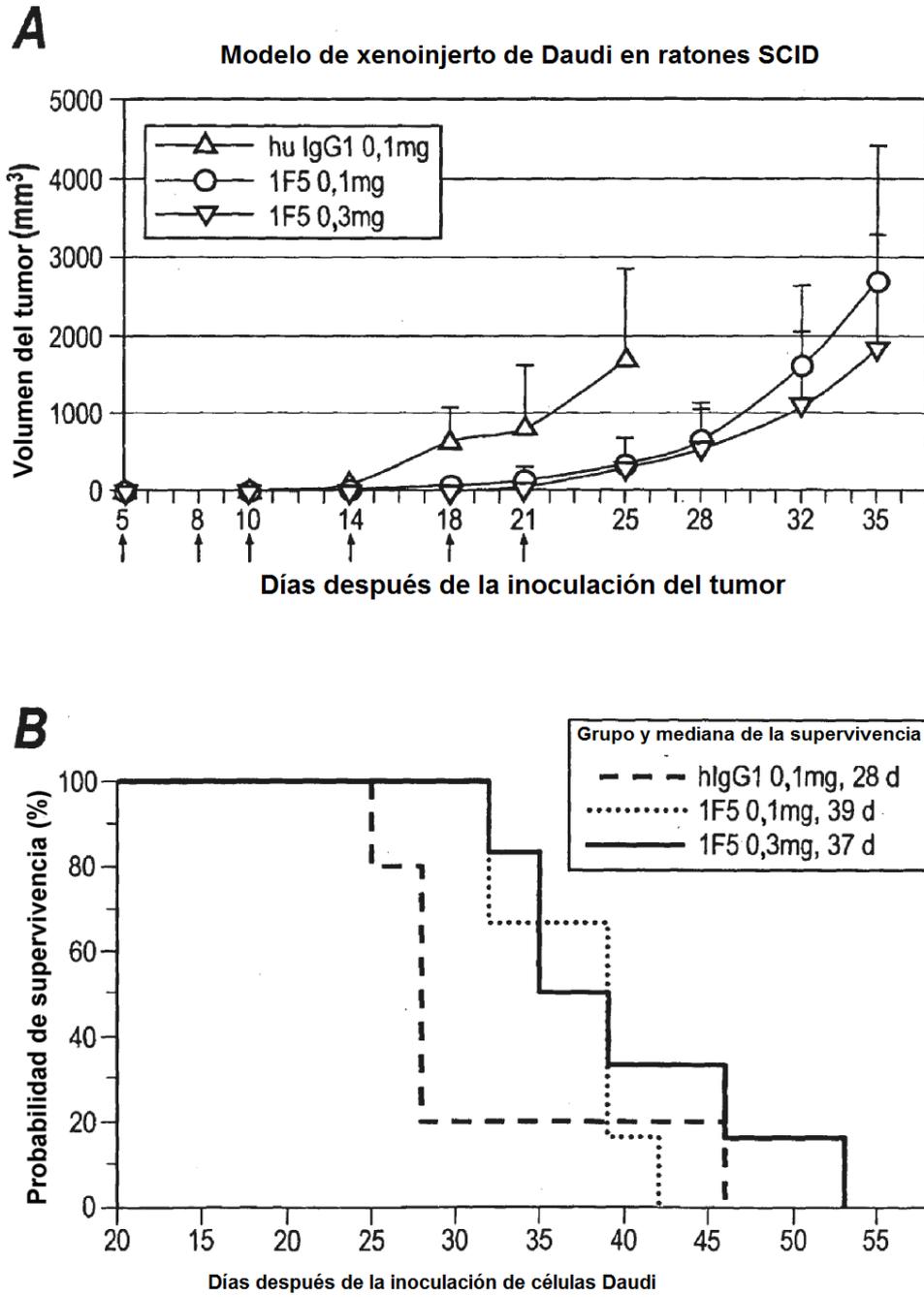


**Fig. 31**

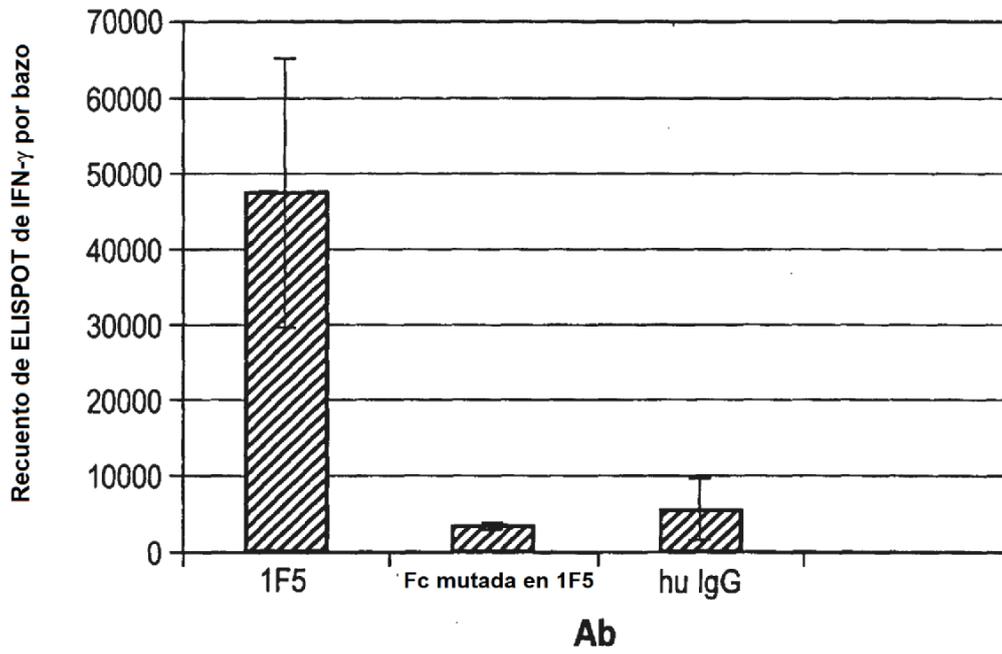
**Modelo de xenoinjerto de Raji en ratones SCID**



**Fig. 32**



**Fig. 33**



**Fig. 34**