

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 155**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2011 E 15151109 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2933268**

54 Título: **Anticuerpos anti-OX40 y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

23.08.2010 US 375999 P

08.09.2010 US 380827 P

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

10.01.2018

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
201 West Seventh Street
Austin, TX 78701, US**

72 Inventor/es:

**LIU, YONG-JUN;
VOO, KUI SHIN;
BOVER, LAURA;
TSURUSHITA, NAOYA;
TSO, J. YUN y
KUMAR, SHANKAR**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 649 155 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-OX40 y procedimientos de uso de los mismos

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere en general a la modulación de la activación del receptor OX40, y más particularmente, a la modulación del receptor OX40 para inhibir la función inmunosupresora de los linfocitos T reguladores de tipo 1 CD4⁺ que producen interleucina 10 (IL-10) ("linfocitos Tr1") y linfocitos T reguladores que expresan Foxp3⁺ (también a veces denominados en el presente documento "linfocitos T reg. Foxp3⁺"), y a la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos CD4⁺ o de linfocitos indiferenciados y a la producción de IL-10.

Antecedentes

- 10 Los linfocitos Tr1 tienen un papel crítico en la tolerancia periférica. Los linfocitos Tr1 son particularmente importantes en la limitación de daños en los tejidos del huésped durante las respuestas inmunitarias inflamatorias. La generación de linfocitos Tr1 acompaña tanto a las respuestas inmunitarias TH1 como TH2 *in vivo* e *in vitro*.

- 15 Los linfocitos Tr1 se generan a partir de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados durante la respuesta inmunitaria de linfocitos T activada por antígenos. Los linfocitos Tr1 son anérgicos en respuesta a la señalización a través de los receptores TCR, CD28 e IL-2 y pueden suprimir la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados impulsada por antígenos *in vivo* e *in vitro*. Los linfocitos Tr1 tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de enfermedades autoinmunes y limitar la magnitud de la respuesta inmunitaria a los patógenos microbianos.

- 20 Aunque se han estudiado las señales moleculares que producen los linfocitos Tr1, se sabe poco sobre las señales moleculares que regulan negativamente la generación de estas células. Aunque se han determinado el papel de fármacos inmunosupresores, citocinas, moléculas coestimuladoras y CD en la inducción de los linfocitos Tr1, todavía no se han encontrado las señales que regulan negativamente la generación de linfocitos Tr1.

Breve resumen de la invención

- 25 La activación del receptor OX40 bloquea la generación de Tr1 a partir de los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados o de memoria, así como la producción de IL-10 por los linfocitos Tr1 y la función inmunosupresora de los linfocitos Tr1. La activación del receptor OX40 también bloquea la producción de IL-10 por los linfocitos T-reg Foxp3⁺ y la función inmunosupresora. Se ha informado de anticuerpos anti-OX40 agonistas aparentes (Weinberg *et al.*, J. Immunother. 29 (2006), 575-585; Piconese *et al.*, J. Exp. Med. 205 (2008), 825-839; publ. de sol. de patente de Estados Unidos N.º 2006/0281072; publ. de sol. de patente de Estados Unidos N.º 2009/0214560; Ruby y Weinberg, Cancer Immunol. Immunother. 58 (2009), 1941-1947).

- 30 En el presente documento se presentan anticuerpos agonistas que se unen al receptor OX40, de forma que el agonista modula la activación del receptor OX40 para bloquear la secreción de citocina IL-10 y/o la función inmunosupresora general de los linfocitos Tr1 y T-reg Foxp3⁺. Esencialmente, los anticuerpos divulgados en el presente documento pueden imitar el ligando OX40 y activar el receptor OX40 en los linfocitos Tr1 y/o los linfocitos T reguladores naturales ("nTreg"), a los que también se denomina "T-reg Foxp3⁺".

- 35 La invención se refiere a las realizaciones tal y como se definen en las reivindicaciones. La invención se refiere a los siguientes puntos:

- 40 1. Un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une al OX40 humano que comprende:
 (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13;
 (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14;
 (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15;
 (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19;
 (e) una región de dominio variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

- 45 2. Un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con el punto 1, que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.

- 50 3. Un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que el anticuerpo aislado es un anticuerpo monoclonal.

4. Un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, en el que el anticuerpo aislado es un anticuerpo humanizado.

5. Un anticuerpo humanizado aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con el punto 4, que

comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 y una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

5 6. Un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de uno cualquiera de los puntos 1 a 5.

7. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de uno cualquiera de los puntos 1 a 5.

8. Un procedimiento para producir un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende la etapa de cultivar la célula huésped de acuerdo con el punto 7, comprendiendo el procedimiento preferiblemente además recuperar el anticuerpo o porción de unión a antígeno de la célula huésped.

9. Un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de cualquiera de los puntos 1 a 5 para uso como medicamento.

10. Un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, del punto 9, en el que el medicamento es para usar en el tratamiento del cáncer.

15 Como se muestra en las solicitudes de patente de Estados Unidos de tramitación conjunta con números de serie 11/659.266 y 12/861.135, OX40L inhibe la generación y la función de los linfocitos Tr1 que producen IL-10 a partir de los linfocitos T CD4+ indiferenciados y de memoria que fueron inducidos por los fármacos inmunosupresores dexametasona y vitamina D3. Se ha descubierto que el OX40L inhibe la generación y la función de los linfocitos T reguladores que producen IL-10. Estos descubrimientos demuestran que la señalización del OX40 por el OX40L inhibe la generación de linfocitos T inmunosupresores que producen IL-10 humana en cultivo. Esta función única del OX40L no es compartida por otros dos miembros coestimuladores de la familia del TNF: el ligando del GITR y el ligando del 4-1BB. El OX40L también es un inhibidor potente de la generación y función de los linfocitos Tr1 que producen IL-10 inducidos por dos estímulos fisiológicos que proporcionan el ligando coestimulador inducible y las CD inmaduras. La señalización del receptor OX40 en los linfocitos T humanos por los anticuerpos monoclonales, las moléculas pequeñas, o por el OX40L, o las proteínas que tienen al menos 90 por ciento de homología con ellos, modula y regula la generación y la función de los linfocitos T inmunosupresores que producen IL-10.

El descubrimiento se presta a numerosas aplicaciones de tratamiento. Por ejemplo, se podrían usar anticuerpos agonistas, moléculas pequeñas, u OX40L para suprimir la generación y la función de los linfocitos T inmunosupresores que producen IL-10 y por lo tanto se podrían usar para mejorar la respuesta inmunitaria para tratar el cáncer y las enfermedades infecciosas, o como adyuvante para vacunas contra el cáncer. Los anticuerpos antagonistas de OX40 u OX40L, o las moléculas pequeñas antagonistas, se podrían usar para mejorar la generación y la función de linfocitos T inmunosupresores que producen IL-10 y por lo tanto se podrían usar para el desarrollo de terapias para enfermedades autoinmunes y enfermedades del injerto contra el huésped. Este descubrimiento también proporciona procedimientos de alto rendimiento para el cribado de anticuerpos o de moléculas pequeñas, ya sea activando el receptor OX40 (o por el contrario bloqueando la señalización de OX40) en los linfocitos T para el desarrollo de terapias para el cáncer, o también, enfermedades autoinmunes, y enfermedades del injerto contra el huésped.

En el presente documento se proporcionan anticuerpos monoclonales y humanos (a veces en el presente documento se denominan "anticuerpos anti-OX40" y/u otras variaciones del mismo) que se unen al receptor OX40 humano. Estos anticuerpos son útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones agudas o crónicas en cuya participa el OX40. En un aspecto, se describe un anticuerpo humano aislado, o una porción de unión a antígeno del mismo, que se une al OX40 humano y es eficaz como tratamiento contra el cáncer o como tratamiento de una enfermedad autoinmune. Cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 divulgados en el presente documento puede usarse como medicamento. Uno o más cualesquiera de los anticuerpos anti-OX40 se pueden usar para tratar uno o más de los diversos cánceres o enfermedades autoinmunes descritos en el presente documento.

Se proporcionan en el presente documento anticuerpos humanizados aislados que se unen a OX40. Los anticuerpos aislados que se describen en el presente documento se unen a OX40, y pueden unirse a OX40 codificado por los siguientes genes: Número de acceso del NCBI: NP_003317, número de acceso de Genpept: P23510, o genes que tienen una homología del 90 por ciento con los mismos. El anticuerpo aislado proporcionado en el presente documento puede unirse además al receptor OX40 que tiene uno de los siguientes números de acceso de GenBank: AAB39944, CAE11757 o AAI05071.

Como se revela en el presente documento, es ejemplar un anticuerpo aislado que se une a OX40 que comprende:

(a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;

(b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3;

(d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7;

(e) una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y

(f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

5 Además, otro ejemplo es un anticuerpo aislado que se une a OX40 que comprende: (a) una región variable de
 cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; (b) una región variable de
 cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; (c) una región variable de
 10 cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; (d) la región variable de
 cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; (e) una región variable de
 cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y (f) una región variable de
 cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.

15 Alternativamente, un anticuerpo aislado puede tener una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la
 secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 o 13; una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende
 la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2 o 14 y/o una región variable de cadena pesada CDR3 que
 15 comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 3 o 15, o una región variable de cadena pesada CDR
 que tiene un 90 por ciento de homología con las mismas.

20 Además, un anticuerpo aislado puede tener una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia
 de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7 o 19; una región variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia
 de aminoácidos de las SEQ ID NO: 8 o 20 y/o una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la
 20 secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9 o 21, o una región variable de cadena pesada que tiene un 90 por
 ciento de homología con las mismas.

25 El anticuerpo aislado puede tener una región variable de cadena ligera ("VL") que comprende la secuencia de
 aminoácidos de las SEQ ID NO: 10, 11, 22 o 23, o una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 por ciento de
 identidad con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10, 11, 22 o 23. El anticuerpo aislado puede tener
 una región variable de cadena pesada ("VH") que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5,
 16 y 17, o una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 por ciento de identidad con las secuencias de
 aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5, 16 y 17. Por tanto, como ejemplo, el anticuerpo aislado puede comprender una
 30 secuencia pesada variable de la SEQ ID NO: 5 y una secuencia ligera variable de la SEQ ID NO: 11, o una
 secuencia que tiene un 90 por ciento de homología con las mismas. Del mismo modo, el anticuerpo aislado puede
 tener una secuencia pesada variable de la SEQ ID NO: 17 y una secuencia ligera variable de la SEQ ID NO: 23 o
 una secuencia que tiene un 90 por ciento de homología con las mismas.

35 El anticuerpo aislado puede tener una cadena ligera variable codificada por la secuencia de ácido nucleico de las
 SEQ ID NO: 12, o 24, o una secuencia de ácido nucleico con al menos un 90 por ciento de identidad con las
 secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 12 o 24. El anticuerpo aislado puede tener una cadena pesada
 variable codificada por una secuencia de ácido nucleico de las SEQ ID NO: 6 o 18, o una secuencia de ácido
 nucleico con al menos un 90 por ciento de identidad con las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 6 o 18.

40 También se proporcionan en el presente documento anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales
 pueden tener una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o 22, o
 una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 por ciento de identidad con las secuencias de aminoácidos de
 las SEQ ID NO: 10 o 22. Se proporcionan además anticuerpos monoclonales que tienen una cadena pesada
 variable que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4 o 16, o una secuencia de aminoácidos
 con al menos un 90 por ciento de identidad con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4 o 16.

45 También se proporciona en el presente documento un ácido nucleico aislado que codifica cualquiera de los
 anticuerpos anti-OX40 revelados en el presente documento. Además, en el presente documento se proporcionan
 células huésped, comprendiendo cada una un ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-OX40
 descritos en el presente documento. Se proporcionan además procedimientos para producir un anticuerpo (tal como
 la célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos anti-OX40 descritos
 en el presente documento) que comprenden cultivar la célula huésped de modo que se produzca el anticuerpo, y/o
 recuperar el anticuerpo de la célula huésped.

50 **Breve descripción de los dibujos**

55 Para que pueda entenderse fácilmente cómo se logran las características, aspectos y ventajas de la invención antes
 citados, así como otros que se pondrán de manifiesto, puede tenerse una descripción más específica que la
 resumida brevemente más arriba por referencia a las realizaciones de la misma que se ilustran en los dibujos que
 forman parte de esta memoria descriptiva. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que los dibujos adjuntos ilustran
 algunas realizaciones de la invención.

La FIG. 1 muestra Treg FOXP3⁺ infiltrados en los tejidos de linfoma folicular (FL) humano en el mismo lugar que los

linfocitos B y los monocitos tumorales. Izquierda: Inmuntinción doble de Treg FOXP3⁺ (rojo) y linfocitos B de linfoma CD20⁺ (verde); Derecha: Treg FOXP3⁺ (rojo) y monocitos/macrófagos/DC CD11c⁺ (verde).

5 Las FIG. 2A y 2B muestran un aumento del número de Treg CD4⁺ FOXP3⁺ en pacientes con FL. Los linfocitos tumorales y las PBMC se obtuvieron de seis donantes sanos para comparar. Los porcentajes de linfocitos T reguladores respecto a los linfocitos T CD4⁺ totales se determinaron mediante análisis por citometría de flujo de Treg CD4⁺ CD25⁺ CD127^{bajo} FOXP3⁺. La FIG. 2A muestra el análisis por FACS representativo de los Treg. Las PBMC de FL y las células tumorales de FL se obtuvieron del mismo paciente. La FIG. 2B muestra el porcentaje de Treg de todos los donantes. La barra horizontal indica las medias.

10 La FIG. 3 muestra el aislamiento de Treg ICOS⁺ FOXP3⁺ o ICOS⁻ FOXP3⁺ de FL. La suspensión de células individuales se obtiene a partir de una muestra de bazo antes de cualquier tratamiento. Las células se descongelaron el día de ensayo. Los linfocitos T enriquecidos en CD4⁺ CD8⁻ CD14⁻ CD16⁻ CD56⁻ CD11c⁻ TCRγδ⁻ se separaron en subconjuntos de CD25^{bajo} y CD25^{alto}. Se clasificaron además los Treg CD4⁺ CD25^{alto}FOXP3⁺ en subconjuntos de ICOS^{alto} e ICOS^{bajo} sobre la base de la expresión superficial de ICOS. La expresión intracelular de FOXP3 se determinó en todos los subconjuntos.

20 La FIG. 4 muestra Treg intratumorales que inhiben la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ CD25⁻ infiltrantes en el FL, y la inhibición podría ser bloqueada parcialmente por anticuerpos de neutralización anti-IL-10. Se cultivaron linfocitos T CD4⁺ CD25⁻ infiltrantes de tumores marcados con CFSE con células tumorales autólogas preactivadas por CD40L recombinante en presencia o ausencia de Treg ICOS⁺ FOXP3⁺ o Treg ICOS⁻ FOXP3⁺ autólogos o anti-IL-10 (10 µg/ml). Después de 72 horas de cultivo, la proliferación de linfocitos CD4⁺ CD25⁻ se determinó mediante análisis por citometría de flujo de la dilución de CFSE.

La FIG. 5 A muestra el análisis intracelular de la producción de citocinas por linfocitos T CD4⁺ indiferenciados determinada por citometría de flujo.

La FIG. 5B muestra la producción de citocinas por linfocitos T CD4⁺ indiferenciados determinada por ELISA.

25 La FIG. 5C muestra la función supresora de los linfocitos Tr1 que producen IL-10 determinada por la incorporación de [³H]-timidina.

La FIG. 6A muestra el análisis intracelular de la producción de citocinas por los linfocitos T CD4⁺ de memoria determinada por citometría de flujo.

La FIG. 6B muestra la producción de IL-10 por los linfocitos T CD4⁺ de memoria determinada por ELISA.

30 La FIG. 7A muestra el análisis intracelular de la producción de citocinas por los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados determinada por citometría de flujo.

La FIG. 7B muestra la producción de IL-10 por los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados determinada por ELISA.

La FIG. 7C muestra el número de linfocitos T viables contados.

35 La FIG. 8A muestra el análisis intracelular de la producción de citocinas por los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados determinado por citometría de flujo.

La FIG. 8B muestra la producción de IL-10 por los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados determinada por ELISA.

La FIG. 8C muestra el análisis intracelular de la producción de citocinas por los linfocitos T CD4⁺ de memoria determinado por citometría de flujo.

La FIG. 8D muestra la producción de IL-10 por los linfocitos T CD4⁺ de memoria determinada por ELISA.

40 La FIG. 8E muestra el análisis intracelular de la producción de citocinas por los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados determinada por citometría de flujo.

La FIG. 8F muestra la producción de IL-10 por los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados determinada por ELISA.

La FIG. 9 muestra la producción de IL-10 por los linfocitos T reguladores determinada por ELISA.

45 La FIG. 10 muestra los resultados del cribado del sobrenadante de los hibridomas anti-OX40 humano contra L-QX40 frente a los linfocitos L parentales determinados por ELISA.

La FIG. 11 muestra el cribado de anticuerpos monoclonales específicos de OX40 humanos determinado mediante análisis por citometría de flujo, incluyendo una realización de un procedimiento de la presente invención.

La FIG. 12 muestra la confirmación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-hOX40 mediante el uso de células SUPM2 que expresan OX40 (SUPM2-OX40), incluyendo una realización de un procedimiento de la

presente invención.

La FIG. 13 muestra anticuerpos monoclonales específicos de OX40 que pueden inhibir la generación de los linfocitos que producen IL-10 (Tr1) a partir de linfocitos T CD4⁺ estimulados por vit D₃ (0,1 μM)/Dex (50 nm), CD32L/ICOSL y anti-CD3/CD28 (0,2 μg/ml), incluyendo una realización de la presente invención. En A se muestran los datos de la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) y en B se muestran los porcentajes de células que producen IL-10 para todos los tratamientos de anticuerpos monoclonales de OX40.

La FIG. 14 muestra los resultados de anticuerpos monoclonales específicos de hOX40 que inhiben la generación de linfocitos Tr1 y estimulan también la proliferación de linfocitos T CD4⁺, incluyendo una realización de un procedimiento de la presente invención.

Las FIG. 15A, 15B, y 15C detallan la titulación de anticuerpos monoclonales anti OX40 por su capacidad para inhibir la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺, incluyendo una realización de un procedimiento de la presente invención. En la FIG. 15A se muestran datos representativos de la FACS y en la FIG. 15B se muestra el porcentaje de linfocitos Tr1 después del tratamiento con nueve anticuerpos monoclonales anti-OX40.

Las FIG. 16A, 16B, y 16C muestran anticuerpos monoclonales anti-OX40 específicos que inhiben la generación de linfocitos Tr1 que producen IL-10 a partir de linfocitos T CD4⁺ y también inhiben la producción de IL-10 por los Treg IL-1 ICOS⁺ CD4⁺ CD25^{alto} CD127⁻ y la función inmunosupresora. Se estimularon Treg ICOS⁺ CD4⁺ CD25^{alto} CD127⁻ recién clasificados (Treg ICOS⁺) con anti-CD3 (0,2 μg/ml) en presencia de células CD32L/ICOSL y células CD32L/OX40L (FIG. 16A) o anticuerpos monoclonales anti-OX40 o un anticuerpo de control (FIG. 16B) durante cinco días. Después, las células se volvieron a estimular con anti-CD3/CD28 durante 24 horas y se ensayó el sobrenadante para determinar la cantidad de IL-10 por inmunosorción ligada a enzimas (ELISA). La FIG. 16C es un ensayo de proliferación basado en monocitos que muestra que dos de los anticuerpos bloquean la función de los Treg ICOS⁺.

Las FIG. 17A y 17B muestran la identificación de anticuerpos monoclonales anti-hOX40 que inhiben la generación de linfocitos Tr1 y bloquean la función de Treg FOXP3⁺CD4⁺CD25^{alto}, incluyendo una realización de un procedimiento de la presente invención. Se muestran análisis de citometría de flujo representativos en la FIG. 17A. Se muestran datos de seis anticuerpos monoclonales en la FIG. 17B.

La FIG. 18 demuestra la identificación de anticuerpos monoclonales anti-hOX40 que no inhiben la generación de los linfocitos Tr1 pero bloquean la función de Treg FOXP3⁺CD4⁺CD25^{alto}.

Las FIG. 19A y 19B muestran anticuerpos anti-hOX40 agonistas que bloquean la función de los Treg CD4⁺CD25^{alto} derivados de linfoma. Se muestran análisis FACS representativos en la FIG. 19A y se muestran datos para todos los experimentos en la FIG. 19B.

La FIG. 20 muestra que los anticuerpos monoclonales anti-hOX40 pueden unirse a los linfocitos T CD4⁺ de rhesus. Como se muestra, seis de los mAb anti-hOX40 pueden unirse a los linfocitos T CD4⁺ de rhesus activados y se unirán a OX40 de rhesus y activarán la señalización de OX40.

La FIG. 21 muestra que cada uno de anticuerpos Hu 106-222 Lote I y II del Ejemplo I se compone de una cadena pesada con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa y una cadena ligera con un peso molecular de aproximadamente 25 kDa. La pureza de los anticuerpos Hu 106-222 Lote I y II parecía ser de más de un 95 %.

La FIG. 22 muestra el análisis de la unión de los anticuerpos 106-122 de ratón, Ch106 y Hu 106-222 (Lote II) a las células L/OX40 (Ejemplo I).

La FIG. 23 representa la estructura esquemática del vector de expresión para el anticuerpo IgG1/kappa Hu106 (vector de expresión). Procediendo en sentido horario desde el sitio Sall en la parte superior, el plásmido contiene la unidad de transcripción de la cadena pesada que comienza por el promotor / potenciador temprano inmediato principal del citomegalovirus humano (CMV) (promotor del CMV) para iniciar la transcripción del gen de la cadena pesada del anticuerpo. A continuación del promotor del CMV está el exón VH, una secuencia genómica que contiene la región constante de cadena pesada gamma-1 humana, incluyendo los exones CH1, de bisagra, CH2 y CH3 con los intrones intermedios, y el sitio de poliadenilación después del exón CH3. Después de la secuencia del gen de la cadena pesada, la unidad de transcripción de la cadena ligera comienza con el promotor del CMV, seguido por el exón VL y una secuencia genómica que contiene el exón de la región constante de la cadena kappa humana (CL) con una parte del intrón anterior, y el sitio de poliadenilación después del exón CL. Después del gen de la cadena ligera está el promotor temprano del SV40 (promotor del SV40), el gen de la xantina guanina fosforribosiltransferasa (gpt) de *E. coli* y un segmento que contiene el sitio de poliadenilación del SV40 (sitio de poli(A) del SV40). Por último, el plásmido contiene una parte del plásmido pUC19, que comprende el origen de replicación bacteriano (pUC ori) y el gen de la beta-lactamasa (beta-lactamasa). En la figura se muestra la localización de los sitios de escisión de las enzimas de restricción relevantes.

La FIG. 24 muestra la comparación de la unión a las células L/OX40 de los anticuerpos Hu 106-222 Lote I y II (Ejemplo I a continuación).

La FIG. 25 muestra que Hu119-122 se compone de una cadena pesada con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa y una cadena ligera con un peso molecular de aproximadamente 25 kDa. La pureza de Hu119 parecía ser superior al 95 % (Ejemplo II a continuación),

5 La FIG. 26 muestra el resultado del análisis por FACS de los anticuerpos Ch119-122 y Hu119-122 descritos en el presente documento (Ejemplo II a continuación).

La FIG. 27 muestra que el clon del mAb humanizado anti-OX40 humano (Hu119), y su anticuerpo mutado de unión a FcR (Hu119-AA) 119-122 potenciaban la proliferación de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados. Hu119-122 procuraba mejor actividad estimulante de los linfocitos T que el mAb anti-OX40 humano (ratón 119-122). Sin embargo, el mAb quimérico anti-OX40 humano (Ch119, VH y VL de ratón, pero regiones constantes gamma-1 y kappa humanas) no logró potenciar la proliferación de los linfocitos T.

10

La FIG. 28 muestra que el clon 106-22 del mAb humanizado anti-OX40 humano mutado de unión a FcR (Hu222AA) y el clon 106-222 del mAb quimérico anti-OX40 humano (Ch222) potenciaban la proliferación de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados estimulados anti-CD3. Estos anticuerpos tienen actividad estimulante similar a la del mAb parental de ratón anti-OX40 humano (Mouse222). Sin embargo, el Ab completamente humanizado anti-OX40 humano, Hu222, no potenciaba la proliferación de linfocitos T en comparación con la IgG1 humana.

15

Las FIG. 29A y B muestran que el clon 119-122 de mAb de ratón anti-OX40 humano bloquea la función supresora de los Treg CD4⁺.

La FIG. 30 proporciona datos que muestran que los anticuerpos anti-OX40 humanos potencian la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ usando anticuerpos unidos a la placa.

20 La FIG. 31 muestra anticuerpos humanizado y de ratón anti-OX40 humano que requieren reticulación para potenciar la proliferación de los linfocitos T.

La FIG. 32 muestra que los anticuerpos anti-OX40 humano bloquean la actividad de los linfocitos nTreg CD4⁺ FOXP3⁺ usando anticuerpos unidos a la placa.

25 La FIG. 33 muestra que una alta concentración de anticuerpos de ratón anti-OX40 humano destruye preferentemente los Treg FOXP3⁺.

La FIG. 34 muestra que los mAb de ratón anti-OX40 humano actúan directamente sobre los linfocitos T efectores o los nTreg para bloquear la función supresora de los Treg.

Las figuras, 35A, 35B y 35C muestran los resultados del tratamiento del tumor con mAb anti-hOX40 en ratones con transferencia adaptativa de linfocitos T hOX40⁺CD8⁺. El mAb anti-OX40 humano promueve la proliferación de los linfocitos T y la supervivencia *in vivo*. El régimen de vacunación terapéutica se muestra en la figura. 35A. Se muestran imágenes de bioluminiscencia *in vivo* representativas en la FIG. 35B. Se muestran los resultados del tratamiento de tumores con anticuerpos en la FIG. 35C.

30

La FIG. 36 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las secuencias de la VH de 106-222, de 106-222 humanizado (Hu106) y X61012 aceptora humana (número de acceso de GenBank). Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. Los números encima de las secuencias indican las localizaciones de acuerdo con Kabat *et al.* ("Sequences of Proteins of Immunological Interests" 5ª edición, n° de publicación del NIH 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las mismas secuencias que se reivindican en el presente documento también se proporcionan en el listado de secuencias y los números de las posiciones pueden ser diferentes. En la Figura 36, las secuencias de las CDR definidas por Kabat *et al.* (1991) aparecen subrayadas en la VH de 106-222. Los residuos de la CDR de la VH de X61012 se omiten en la figura. Se buscaron secuencias de VH humana homólogas a la región estructural de la VH de 106-222 en la base de datos GenBank, y se eligió la secuencia de la VH codificada por el ADNc humano X61012 (VH de X61012) como aceptora para la humanización. Las secuencias de las CDR de la VH de 106-222 se transfirieron primero a las posiciones correspondientes de la VH de X61012. A continuación, en las posiciones de la región estructural en que el modelo tridimensional de las regiones variables de 106-222 indicaba un contacto importante con las CDR, los residuos de aminoácidos de ratón de la VH de 106-222 fueron sustituidos por los residuos humanos correspondientes. Estas sustituciones se llevaron a cabo en las posiciones 46 y 94 (subrayadas en la VH del Hu106). Además, un resto de la región estructural humana que se encontró que era atípico en el correspondiente subgrupo de la región V ha sido sustituido por el residuo más típico para reducir la inmunogenicidad potencial. Esta sustitución se llevó a cabo en la posición 105 (doble subrayado en la VH de Hu106).

35

40

45

50

La FIG. 37 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las secuencias de la VL de 106-222, de 106-222 humanizado (Hu106) y AJ388641 (número de acceso de GenBank) aceptora humana. Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. Los números encima de las secuencias indican las localizaciones de acuerdo con Kabat *et al.* (1991). Las mismas secuencias que se reivindican en el presente documento también se proporcionan en el listado de secuencias aunque los números de las posiciones pueden ser diferentes. Las secuencias de las CDR definidas por Kabat *et al.* (1) están subrayadas en la VH del 106-222. Los residuos de las

55

CDR de la VL de AJ388641 se omiten en la figura. Se buscaron secuencias de VL humana homólogas a la región estructural de la VL de 106-222 en la base de datos GenBank, y se eligió la secuencia de la VL codificada por el ADNc humano AJ388641 (VL de AJ388641) como aceptora para la humanización. Las secuencias de las CDR de la VL de 106-222 se transfirieron a las posiciones correspondientes de la VL de AJ388641. No se llevaron a cabo sustituciones en la región estructural en la forma humanizada.

La FIG. 38 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de la VH de Hu106 flanqueada por los sitios Spel y HindIII (subrayados) junto con la secuencia de aminoácidos deducida. Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. La secuencia del péptido señal está en cursiva. El residuo de aminoácido N-terminal (Q) de la VH madura está doblemente subrayado. Las secuencias de las CDR de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991) están subrayadas. Las mismas secuencias que se reivindican en el presente documento también se proporcionan en el listado de secuencias y los números de las posiciones pueden ser diferentes en el listado de secuencias. La secuencia del intrón está en cursiva. Se clonó el fragmento del gen de la VH de Hu106 digerido con Spel y HindIII entre los sitios correspondientes en el vector de expresión que se muestra en la Figura 23.

La FIG. 39 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de la VL de Hu106-222 flanqueado por sitios NheI y EcoRI (subrayados) junto con la secuencia de aminoácidos deducida. Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. La secuencia del péptido señal está en cursiva. El residuo de aminoácido N-terminal (D) de la VL madura está doblemente subrayado. Las secuencias de las CDR de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991) están subrayadas. La secuencia del intrón está en cursiva, se clonó el fragmento del gen de la VL de Hu106 digerido con NheI y EcoRI entre los sitios correspondientes en el vector de expresión que se muestra en la FIG. 23. Las mismas secuencias que se reivindican en el presente documento también se proporcionan en el listado de secuencias, aunque los números de las posiciones pueden ser diferentes en el listado de secuencias.

La FIG. 40 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las secuencias de la VH de 119-122, de 119-122 humanizado (Hu119), y Z14189 (número de acceso de GenBank) aceptora humana. Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. Los números encima de las secuencias indican las localizaciones de acuerdo con Kabat et al. ("Sequences of Proteins of Immunological Interests", 5ª edición, n.º de publicación del NIH 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de las CDR definidas por Kabat et al. (1991) están subrayadas en la VH del 119-122. Los residuos de las CDR de la VH de Z14189 se omiten en la figura. Se buscaron secuencias de la VH humana homólogas a la región estructural de la VH de 119-122 en la base de datos GenBank, y se eligió la secuencia de la VH codificada por el ADNc Z14189 humano (VH de Z14189) como aceptora para la humanización. Las secuencias de la CDR de la VH de 119-122 se transfirieron primero a las posiciones correspondientes de la VH de Z14189. A continuación, en las posiciones de la región estructural en que el modelo tridimensional de las regiones variables de 119-122 indicaba un contacto importante con las CDR, los residuos de aminoácidos de ratón de la VH de 119-122 fueron sustituidos por los residuos humanos correspondientes. Estas sustituciones se llevaron a cabo en las posiciones 26, 27, 28, 30 y 47 (subrayadas en la secuencia de la VH de Hu119) como se muestra en la figura. Las mismas secuencias que se reivindican en el presente documento también se proporcionan en el listado de secuencias, aunque los números de las posiciones pueden ser diferentes en el listado de secuencias.

La FIG. 41 muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las secuencias de la VL de 119-122, 119-122 humanizado (Hu119), y M29469 (número de acceso de GenBank). Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. Los números encima de las secuencias indican las localizaciones de acuerdo con Kabat et al. (1991). Las secuencias de las CDR definidas por Kabat et al. (1) están subrayadas en la VL de 119-122. Los residuos de las CDR de la VL de M29469 se omiten en la secuencia. Se buscaron secuencias de VL humana homólogas a las estructuras de la VL de 119-122 en la base de datos GenBank, y se eligió la secuencia de VL codificada por el ADNc humano M29469 (VL de M29469) como aceptora para la humanización. Las secuencias de las CDR de la VL de 119-122 se transfirieron a las posiciones correspondientes de la VL de M29469. No hizo falta ninguna sustitución estructural en la forma humanizada. Las mismas secuencias que se reivindican en el presente documento también se proporcionan en el listado de secuencias, aunque los números de las posiciones pueden ser diferentes en el listado de secuencias.

La FIG. 42 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de la VH de Hu119 flanqueada por sitios Spel y HindIII (subrayados) junto con la secuencia de aminoácidos deducida. Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. La secuencia del péptido señal está en cursiva. El residuo de aminoácido N-terminal (E) de la VH madura está doblemente subrayado. Las secuencias de las CDR de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991) están subrayadas. La secuencia del intrón está en cursiva. Se clonó el fragmento del gen de la VH de Hu119 digerido con Spel y HindIII entre los sitios correspondientes en el vector de expresión que se muestra en la FIG. 23. Las mismas secuencias que se reivindican en el presente documento también se proporcionan en el listado de secuencias, aunque los números de las posiciones pueden ser diferentes en el listado de secuencias.

La FIG. 43 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de la VL de Hu119 flanqueada por sitios NheI y EcoRI (subrayados) junto con la secuencia de aminoácidos deducida. Los residuos de aminoácidos se muestran en código de una letra. La secuencia del péptido señal está en cursiva. El residuo de aminoácido N-terminal (E) de la VL madura está doblemente subrayado. Las secuencias de las CDR de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991) están subrayadas. La secuencia del intrón está en cursiva. Se clonó el fragmento del gen de la VL de Hu119 digerido

con NheI y EcoRI entre los sitios correspondientes en el vector de expresión que se muestra en la figura. 23. Las mismas secuencias que se reivindican en el presente documento también se proporcionan en el listado de secuencias, aunque los números de las posiciones pueden ser diferentes en el listado de secuencias.

Descripción detallada

5 El término "anticuerpo" incluye una molécula de inmunoglobulina compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (que en el presente documento se abrevia HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera ((que en el presente documento se abrevia LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o "porción de anticuerpo") incluye fragmentos de un anticuerpo que mantienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hOX40). Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo pueden realizarla fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consta de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consta de los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al, (1989) Nature 341: 544-546), que consta de un dominio VH y (vi) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse, usando procedimientos recombinantes, con un enlazador sintético que les permite formar una única cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (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 Dichos anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que estén englobados dentro de la expresión "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se engloban otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de esta manera a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448, Poljak, R. J. et al. (1994) Structure 2: 1121-1123). Aún más, un anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión de mayor tamaño, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o porción de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región flanqueada de estreptavidina para elaborar una molécula tetramérica scFv (Kipriyanov, S. M. et al. (1995) "Human Antibodies and Hybridomas" 6: 93-101) y el uso de un residuo de cisteína, un péptido marcador y una marca de polihistidina C-terminal para elaborar moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31:1047-1058). Las porciones de anticuerpo, tales como los fragmentos Fab y F(ab')₂, pueden prepararse a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos enteros. Además, los anticuerpos, porciones de anticuerpo y moléculas de inmunoadhesión pueden obtenerse usando técnicas de ADN recombinante estándares, como se describe en el presente documento. Las porciones de unión a antígeno preferidas son dominios completos o pares de dominios completos.

OX40/ligando de OX40 (receptor de OX40)/(OX40L) son un par de moléculas coestimuladoras críticas para la proliferación y supervivencia de los linfocitos T, la producción de citocinas y la generación de células de memoria. Los experimentos *in vitro* iniciales demostraron que la señalización a través de OX40 en los linfocitos T CD4⁺ conduce al desarrollo de TH2, pero no de TH1. Estos resultados fueron apoyados por estudios *in vivo* que muestran que el bloqueo de la interacción OX40/OX40L evitaba la inducción y el mantenimiento de respuestas inmunitarias alérgicas mediadas por TH2. Sin embargo, el bloqueo de la interacción OX40/OX40L mejora o impide enfermedades mediadas por TH1. Además, se mostró que la administración de OX40L soluble o la transferencia de genes de OX40L a los tumores potencia fuertemente la inmunidad antitumoral en ratones. Estudios recientes sugieren también que OX40/OX40L pueden desempeñar un papel en la estimulación de respuestas inmunitarias mediadas por linfocitos T. Como se analiza en el presente documento, la señalización de OX40 bloquea la función inhibidora de los linfocitos T reguladores CD4⁺ CD25⁺ naturales y el par OX40/OX40L desempeña un papel crítico en la regulación global de la inmunidad periférica frente a la tolerancia.

Las expresiones "numeración de Kabat", "definiciones de Kabat" y "marcaje de Kabat" se usan indistintamente en el presente documento. Estos términos, que son reconocidos en la técnica, se refieren a un sistema de numeración de

residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo, o una porción de unión a antígeno del mismo (Kabat *et al.* (1971) Ann. Acad. Sci. 190: 382-391 y, Kabat, E. A. *et al.* (1991) "Sequences of Immunological Interest", 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, n.º de publicación del NIH: 91-3242).

- 5 La frase "anticuerpo humano recombinante" incluye anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una colección de anticuerpos humanos combinatoria recombinante, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico con genes de la inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor, L. D., *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295) o
- 10 anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de línea germinal humana (véase Kabat, E. A. *et al.* (1991) "Sequences of Immunological Interest", 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, n.º de publicación del NIH: 91-3242).
- 15 Un "anticuerpo aislado" incluye un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hOX40 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de hOX40). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hOX40 puede unirse a moléculas de OX40 de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.
- 20 El término "actividad" incluye actividades tales como la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno, por ejemplo, un anticuerpo anti-OX40 humano que se une a un antígeno OX40 y/o la potencia de activación de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-OX40 cuya unión al receptor de hOX40 activa la actividad biológica de hOX40 o la activación de la unión al receptor en un ensayo celular de L/OX40 .
- 25 El término " K_{off} ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno. El término " K_d ", como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.
- La frase "resonancia de plasmón superficial" incluye un fenómeno óptico que permite analizar las interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase el Ejemplo 5 y Jonsson, U., *et al.* (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Liu, *et al.* (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnson, B., *et al.* (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131 y Johnson, B., *et al.* (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.
- 30 El término "vector" incluye una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha ligado. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo los vectores no episómicos de mamífero) se pueden
- 35 integrar en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y por lo tanto, se replican junto con el genoma del huésped. Además, ciertos vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están ligados operativamente. En el presente documento dichos vectores se denominan "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva,
- 40 "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, se pretende incluir dichas otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus sin capacidad de replicación, adenovirus y virus adenoasociados), que sirven para funciones equivalentes.
- 45 La frase "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped") incluye una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichos términos pretenden referirse no sólo a la célula en cuestión particular, sino a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse ciertas modificaciones en generaciones sucesivas debido ya sea a mutaciones o a influencias ambientales, dicha progenie puede no ser idéntica, de hecho, a la célula parental, pero todavía se incluye dentro del alcance de la expresión "célula huésped" como se usa en el presente documento.
- 50 La expresión "anticuerpo monoclonal" (mAb) se refiere a un anticuerpo, o población de anticuerpos similares, obtenidos a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, y no ha de interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo mediante un procedimiento particular, e incluye pero no se limita a los anticuerpos monoclonales que pueden elaborarse por el procedimiento del hibridoma descrito primero por Kohler y Milstein (*Nature*, 256: 495-497, 1975), o por procedimientos de ADN recombinante.

La expresión "anticuerpo quimérico" (o "inmunoglobulina quimérica") hace referencia a una molécula que comprende una cadena pesada y/o ligera que es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias de los anticuerpos derivados de una especie concreta o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpo concreto, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de los anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos concretos, así como a fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (Cabilly *et al.* (1984), *infra*; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851).

La expresión "anticuerpo humanizado" hace referencia a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos), así como anticuerpos humanos. Un anticuerpo humanizado puede incluir sustituciones conservadoras de aminoácidos o residuos no naturales de la misma o diferentes especies que no alteren de manera significativa su actividad de unión y/o biológica. Dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulinas no humanas. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) como ratón, rata, camello, bovino, cabra, o conejo que tengan las propiedades deseadas. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de las CDR ni de la región estructural importadas. Estas modificaciones se realizan para perfeccionar y maximizar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá todos o sustancialmente todos de al menos uno, y en un aspecto dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana.

Opcionalmente, el anticuerpo humanizado también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), o de una inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Cabilly *et al.*, pat. de EE. UU. n.º 4.816.567; Cabilly *et al.*, patente europea n.º 0.125.023 B1; Boss *et al.*, pat. de EE. UU. n.º 4.816.397; Boss *et al.*, patente europea n.º 0.120.694 B1; Neuberger, M. S. *et al.*, documento WO 86/01533.; Neuberger, M. S. *et al.*, patente europea n.º 0.194.276 B1; Winter, pat. de EE. UU. n.º 5.225.539; Winter, patente europea n.º 0.239.400 B1; Padlan, E. A. *et al.*, solicitud de patente europea n.º 0.519.596 A1; Queen *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 86: 10029-10033).

En el presente documento, se puede hacer referencia en singular o en plural a cada uno de los anticuerpos descritos y reivindicados, como: "Anticuerpo anti-OX40"; "anticuerpo anti-hOX40"; "anticuerpo monoclonal anti-hOX40"; "anticuerpo anti-OX40 humano"; "mAb anti-OX40 humano"; "mAb anti-hOX40"; "anticuerpo monoclonal específico de hOX40"; "anticuerpo anti-OX40L"; "anticuerpo anti-hOX40L"; "anticuerpo anti-OX40L humano"; "anticuerpo específico de OX40 humano"; "anticuerpo monoclonal específico de OX40 humano"; "anticuerpo específico de OX40 humano"; "anticuerpo específico anti-OX40 humano"; "anticuerpo monoclonal específico anti OX40 humano"; "anticuerpo específico de h-OX40"; "anticuerpo monoclonal específico de h-OX40"; "anticuerpo agonista de hOX40"; "antagonista de hOX40" y/u otras variaciones similares de los mismos.

Como se divulga en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 11/659.266 titulada "Methods to Treat Disease States by Influencing the Signaling of OX-40-Receptors and High Throughput Screening Methods and Identifying Substrates Thereof", se descubrió que una función de OX40L es la regulación negativa de la generación de linfocitos Tr1 inducida por los agentes inmunosupresores Dex y vit D3, ICOSL, o DC inmaduras. Este descubrimiento demuestra un mecanismo general por el que OX40L potencia la inmunidad e inactiva la tolerancia inmunológica.

Con el uso de análisis inmunohistológico (FIG. 1), la tinción intracelular (FIG. 2), y la clasificación de células (FIG. 3), se ha demostrado que tanto los Treg ICOS⁺ que producen IL-10 como los ICOS⁻ que producen TGF- β se infiltraban en los tejidos de FL humanos. Estos Treg FOXP3⁺ derivados de FL pueden inhibir fuertemente la proliferación de linfocitos T FOXP3⁻ CD4⁺ CD25⁻ infiltrantes de tumor en respuesta a las células de linfoma autólogas preactivadas por el ligando CD40⁻ (FIG. 4). La actividad supresora de los Treg ICOS⁺ podría bloquearse parcialmente por un anticuerpo anti-IL-10 neutralizante, lo que confirma el papel de los Treg ICOS⁺ que producen IL-10 en FL (FIG. 4). En el experimento de la FIG. 2, se obtuvieron células tumorales y PBMC de 7 pacientes con un diagnóstico inicial antes de la terapia. También se obtuvieron PBMC de 7 donantes sanos para comparar. Los porcentajes de linfocitos T reguladores respecto a los linfocitos T CD4⁺ totales se determinaron mediante análisis por citometría de flujo de Treg CD4⁺ CD25⁺ CD127^{bajo} FOXP3⁺. La FIG. 2A proporciona un análisis por FACS representativo de los Treg, mientras que la FIG. 2B muestra el porcentaje de Treg reguladores de todos los donantes.

También se descubrió que OX40L inhibe la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ inducida por Dex y vit D3. Se sabe que una combinación de los fármacos inmunosupresores Dex y vit D3 induce consistentemente la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados en linfocitos Tr1. Para investigar si OX40L puede inhibir la generación y función de los linfocitos Tr1, se cultivaron linfocitos T CD4⁺ indiferenciados con anticuerpos monoclonales anti-CD3 más anti-CD28 en presencia o ausencia de células L transfectadas con OX40L en cuatro condiciones de cultivo diferentes, incluyendo: (1) Tr1 (Dex y D3 vit); (2) TH1 (IL-12); (3) TH2 (IL-4); o (4) neutro (medio solo) durante 7 días (FIG. 5A). Se analizó la producción de IL-10 por los linfocitos T cebados por tinción intracelular de citocinas y ELISA.

En los experimentos de la FIG. 5A, se llevó a cabo un análisis intracelular de la producción de citocinas por los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados mediante citometría de flujo. Se cultivaron linfocitos T indiferenciados CD4⁺ con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de IL-2 en las células L parentales o en células OX40L-L con las citocinas recombinantes o reactivos indicados durante 7 días. Los porcentajes de linfocitos T que producen citocinas respectivos se indican en cada perfil de transferencia puntual (dot blot). Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados inducidos por las diferentes señales de polarización. Como se muestra en la FIG. 5A, se generaron entre el 2 % y el 4 % de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados cultivados en condiciones neutras o de TH1 o TH2. Se generaron más de un 15 % de linfocitos Tr1 en cultivo con Dex más vit D3. La adición de OX40L bloqueaba completamente la generación de linfocitos Tr1, pero promovía la generación de linfocitos T que producen TNF- α en todas las condiciones de cultivo.

Estos datos fueron confirmados por los datos de los ELISA (FIG. 5B). En los experimentos de la FIG. 5B, se midió por ELISA la producción de citocinas por linfocitos CD4⁺ indiferenciados en los sobrenadantes después de la reestimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 horas. Se cultivaron linfocitos T CD4⁺ indiferenciados con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 en presencia de IL-2 en células L parentales o células OX40L-L con las citocinas recombinantes o reactivos indicados durante 7 días. Los datos se muestran como media \pm error estándar de la media (SEM) de cuatro experimentos independientes. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados inducidos por las diferentes señales de polarización.

Los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados sensibilizados con la condición Tr1 (Dex más Vit D3) eran anérgicos y tenían la capacidad de suprimir la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados en respuesta a anticuerpos monoclonales anti-CD3 más anti-CD28 (FIG. 5C). En el experimento de la FIG. 5C, se midió la función de supresión de los linfocitos T por la incorporación de [³H]-timidina. Las mezclas de las poblaciones de linfocitos T indicadas se volvieron a estimularon con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28. Las barras de error representan el SEM de los pocillos por triplicado. Se ha descubierto que los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados sensibilizados con la misma condición Tr1 en presencia de OX40L proliferaban vigorosamente y no conseguían inhibir la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados en respuesta a anticuerpos monoclonales anti-CD3 más anti-CD28. Los datos sugieren que OX40L bloquea la generación de linfocitos Tr1 funcionales a partir de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados inducidos por Dex y vit. D3.

Se ha descubierto que los linfocitos Tr1 se pueden generar a partir de linfocitos T CD4⁺ CD45RA⁻ CD45RO⁺ de memoria, y que OX40L puede inhibir la generación de linfocitos Tr1 a partir de los linfocitos T CD4⁺ de memoria. Se cultivaron linfocitos T CD4⁺ CD45RA⁻ CD45RO⁺ durante 7 días con anticuerpos monoclonales anti-CD3 más anti-CD28 en presencia o ausencia de células L transfectadas con OX40L con las condiciones Tr1 (Dex más vit D3). En los experimentos de la FIG. 6A, se llevó a cabo un análisis intracelular de la producción de citocinas por los linfocitos T CD4⁺ de memoria mediante citometría de flujo. Se cultivaron linfocitos T CD4⁺ CD45RO⁺ CD25⁻ de memoria con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD28 e IL-2 en las células L parentales o células OX40L-L en presencia o ausencia de Dex más D3 vit durante 7 días. Los porcentajes de linfocitos T que producen citocinas respectivos se indican en cada perfil de transferencia puntual (dot blot). Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ de memoria en condiciones de Dex más vit. D3. La FIG. 6A muestra que se generaba un gran número de linfocitos Tr1 (> 20 %) a partir de linfocitos T CD4⁺ de memoria en cultivo con Dex más vit. D3. La adición de OX40L bloqueaba completamente la generación de linfocitos Tr1 y promovía la generación de linfocitos T CD4⁺ de memoria que producen TNF- α .

La capacidad de Dex más vit. D3 para promover la producción de IL-10 en los linfocitos T CD4⁺ de memoria, y que esta capacidad puede ser inhibida por OX40L, fueron confirmados por análisis ELISA de IL-10 (FIG. 6B). En los experimentos de la FIG. 6B, se midió mediante ELISA la producción de IL-10 por los linfocitos T CD4⁺ de memoria en los sobrenadantes después de la reestimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 horas. Los datos se muestran en términos de la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ de memoria en condiciones con Dex más D3 vit.

Se descubrió además que OX40L inhibe la generación de linfocitos Tr1, mientras que otros miembros de la familia TNF(GITR1 y 4-1BBL) no lo hacen. Dentro de la superfamilia del TNF, OX40L, el ligando de receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR1), y el ligando 4-LBB (4-1BBL) tienen una función coestimulante para linfocitos T. Para investigar si OX40L era único en la inhibición de los linfocitos Tr1, se cultivaron linfocitos T CD4⁺ indiferenciados con anticuerpos monoclonales anti-CD3 más anti-CD28 con Dex más vit D3, con células L parentales o células L transfectadas con OX40L, GITR1 o 4-1BBL durante 7 días. Aunque OX40L, GITR1, y 4-1BBL promueven todos la generación de células que producen TNF- α , solamente OX40L inhibía la generación de linfocitos Tr1 (FIG. 7A y 7B).

En los experimentos de la FIG. 7A, se llevó a cabo un análisis intracelular de la producción de citocinas por linfocitos T CD4⁺ indiferenciados mediante citometría de flujo. Se cultivaron linfocitos T CD4⁺ indiferenciados con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 e IL-2 en células L parentales, células OX40L-L, células GITR1-L o células 4-1BBL-L en presencia de Dex más vit D3 durante 7 días. Los porcentajes de linfocitos T que producen citocinas

respectivos se indican en cada perfil de transferencia puntual (dot blot). Los resultados muestran que OX40L, pero no GITR1 ni 4-1BBL, inhibe la generación de linfocitos Tr1.

En los experimentos de la FIG. 7B, se midió la IL-10 producida por los linfocitos CD4⁺ en los sobrenadantes después de la reestimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 h por ELISA. Los datos se muestran en términos de la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. Los resultados muestran que OX40L, pero no GITR1 ni 4-1BBL, inhibe la generación de linfocitos Tr1.

OX40L, GITR1 y 4-1BBL promovían todos un aumento del número total de linfocitos T (FIG. 7C). En los experimentos de la FIG. 7C, se contó el número de linfocitos T viables. Los datos se muestran en términos de la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes.

Como entenderán los expertos en la técnica, los resultados de las FIG. 7A, 7B, 7C muestran que GX40L, pero no GITR1 ni 4-1BBL, inhibe la generación de linfocitos Tr1. Estos datos sugieren que, entre los tres miembros de la superfamilia del TNF conocidos por coestimular linfocitos T, OX40L tiene una función novedosa y única en la inhibición de la generación de linfocitos Tr1.

Se descubrió además que OX40L inhibe la generación de linfocitos Tr1 inducidos por ICOSL o las DC inmaduras. ICOS y CD28 representan los dos receptores coestimuladores positivos dentro de la familia de CD28 expresados en los linfocitos T. La señalización mediante ICOS de los anticuerpos agonistas o ICOSL se ha mostrado que estimula a los linfocitos T CD4⁺ a producir IL-10. Para investigar si OX40L puede inhibir la capacidad de ICOS de inducir la producción de IL-10 por los linfocitos T CD4⁺, se cultivaron linfocitos T CD4⁺ indiferenciados y de memoria con anti-CD3 en presencia de células L transfectadas con ICOSL o células L transfectadas con ICOSL en presencia de OX40L durante 7 días.

En los experimentos de la FIG. 8A, se llevó a cabo un análisis intracelular de la producción de citocinas por linfocitos T CD4⁺ indiferenciados mediante citometría de flujo. Se cultivaron linfocitos T CD4⁺ indiferenciados durante 7 días en células L parentales, en una mezcla de células ICOSL-L y células L, o en una mezcla de células ICOSL-L y células OX40L-L, que se prerrecubrieron con anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los porcentajes de linfocitos T que producen citocinas respectivos se indican en cada perfil de transferencia puntual (dot blot). Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados inducidos por ICOSL.

En los experimentos de la FIG. 8B, se midió por ELISA la producción de IL-10 en los linfocitos CD4⁺ indiferenciados en los sobrenadantes después de la reestimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 h. Se cultivaron linfocitos T CD4⁺ indiferenciados durante 7 días en células L parentales, en una mezcla de células ICOSL-L y células L, o en una mezcla de células ICOSL-L y células OX40L-L, que se prerrecubrieron con anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los datos se muestran en términos de la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados inducidos por ICOSL.

En los experimentos de la FIG. 8C, se llevó a cabo un análisis intracelular de la producción de citocinas por los linfocitos T CD4⁺ de memoria mediante citometría de flujo. Se cultivaron linfocitos T CD4⁺ de memoria durante 7 días en células L parentales, en una mezcla de células ICOSL-L y células L, o en una mezcla de células ICOSL-L y células OX40L-L, que se prerrecubrieron con anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los porcentajes de linfocitos T productores de citocinas respectivos se indican en cada perfil de transferencia puntual. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos CD4⁺ de memoria inducidos por ICOSL.

En los experimentos de la FIG. 8D, se midió por ELISA la producción de IL-10 por linfocitos T CD4⁺ de memoria en los sobrenadantes después de la reestimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 h. Se cultivaron linfocitos T CD4⁺ de memoria durante 7 días en células L parentales, en una mezcla de células ICOSL-L y células L, o en una mezcla de células ICOSL-L y células OX40L-L, que se prerrecubrieron con anticuerpo monoclonal anti-CD3. Los datos se muestran en términos de la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ de memoria inducidos por ICOSL.

Los resultados de los experimentos de las FIG. 8A, 8B, 8C, y 8D muestran que ICOSL promovía significativamente la generación de linfocitos Tr1 a partir tanto de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados como de memoria. La adición de OX40L inhibía completamente la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ tanto indiferenciados como de memoria, mientras que promovía fuertemente la generación de células que producen TNF- α .

Se sabe que las DC inmaduras o DC tratadas con IFN- α o IL-10 pueden inducir a linfocitos T CD4⁺ indiferenciados a diferenciarse en linfocitos Tr1. Se investigó si OX40L podía inhibir la generación de linfocitos Tr1 inducidos por DC. Como se muestra en la FIG. 8E, las DC inmaduras o DC tratadas con IL-10 o IFN- α inducían todas la generación de más de un 10 % de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados. Por el contrario, las DC activadas por CD40L inducen una fuerte respuesta TH1, acompañada por la generación de aproximadamente un 3 % de linfocitos Tr1. La adición de OX40L recombinante a cultivos de DC-linfocitos T inhibía completamente la generación de linfocitos Tr1 inducidos por DC inmaduras y DC tratadas con IL-10 e IFN- α . Además, OX40L también inhibía la generación del número residual de linfocitos Tr1 inducidos por DC maduras activadas por CD40L. En los

experimentos de la FIG. 8E, se llevó a cabo un análisis intracelular de la producción de citocinas por los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados mediante citometría de flujo. Se cocultivaron linfocitos T CD4⁺ indiferenciados en presencia o ausencia de OX40L recombinante soluble durante 7 días con DC inmaduras o DC cultivadas con IFN- α , IL-10 y CD40L. Los porcentajes de linfocitos T que producen citocinas respectivos se indican en cada perfil de transferencia puntual (dot blot). Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de linfocitos Tr1 a partir de los linfocitos T CD4⁺ inducidos por DC.

La capacidad de OX40L de inhibir la generación de linfocitos Tr1 inducidos por DC se confirmó por los datos de ELISA (FIG. 8F). En los experimentos de la FIG. 8F, se midió la producción de IL-10 por los linfocitos CD4⁺ indiferenciados en los sobrenadantes después de la reestimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28 durante 24 horas mediante ELISA. Se cocultivaron linfocitos T CD4⁺ indiferenciados en presencia o ausencia de OX40L recombinante soluble durante 7 días con DC inmaduras o DC cultivadas con IFN- α , IL-10 y CD40L. Los datos se muestran en términos de la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Los resultados muestran que OX40L inhibe la generación de linfocitos Tr1 a partir de los linfocitos T CD4⁺ inducidos por DC. Por tanto, estos datos demuestran que OX40L podría inhibir la generación de linfocitos Tr1 inducidos por señales más fisiológicas proporcionadas por ICOSL y DC.

Anteriormente se ha sugerido que los linfocitos T reguladores están altamente representados en el área del linfoma de linfocitos B no de Hodgkin y que los linfocitos B están implicados en la quimiotaxis de los linfocitos T reguladores en el área del linfoma. Se investigó si influir en la señalización de los receptores OX40, por ejemplo a través de OX40L, podría proporcionar una terapia contra el linfoma de linfocitos B. Se usaron muestras crioconservadas de pacientes con linfoma de linfocitos B para estimar la capacidad de OX40L de desactivar los linfocitos Tr1. Las muestras utilizadas eran de linfoma folicular obtenido a partir de una muestra de bazo antes de cualquier tratamiento. Se descongelaron las células, procurando 400x10⁶ células congeladas 127x10⁶ células vivas y 33,9x10⁶ células muertas (79 % de viabilidad). Se identificaron un número suficiente de células CD25⁺ por tinción con FACS. En los experimentos de la FIG. 9, se determinó por ELISA la secreción de IL-10 en los Treg ICOS⁺ que producen IL-10. Se cultivaron los linfocitos Treg en dos condiciones diferentes. En la condición 1, se cultivaron las células CD25⁺/COS con anti-CD3 en presencia de IL-2 (900 μ l/ml) en células L parentales o células OX40L-L con el anticuerpo anti-ICOS durante 3-6 días. En la condición 2, se cultivaron las células CD25⁺/COS⁺ con anti-CD3 en presencia de IL-2 (900 μ l/ml) en células L ICOS-L o una mezcla de OX40L-L y células L ICOS-L durante 3-6 días. Se midió mediante ELISA la producción de citocinas en los sobrenadantes. Los resultados muestran que OX40L inhibía en gran medida la producción de IL-10 por linfocitos Treg.

Los hallazgos de que OX40L tiene la capacidad de inhibir la generación y función de los linfocitos Tr1 inducidos por los fármacos inmunosupresores Dex más vit D3, ICOSL o DC, destacan un mecanismo novedoso por el cual OX40L promueve la inmunidad e inactiva la tolerancia durante las diferentes formas de respuestas inmunitarias mediadas por CD4 o CD8, tal como comprendería un experto en la técnica. La capacidad de OX40L de inhibir la generación de linfocitos Tr1 durante las respuestas tanto TH1 inducida por IL-12 como TH2 inducida por IL-4 sugiere que OX40L puede controlar la magnitud de las respuestas inmunitarias mediadas por TH1 o TH2. Además, la capacidad de OX40L de inhibir la generación de linfocitos Tr1 parece ser una propiedad única de OX40L, porque los otros dos miembros de la familia de TNF, GITR1 y 4-1BBL, no tienen esta propiedad funcional. Además, la capacidad de OX40L de inhibir la producción de IL-10 en los linfocitos Treg identifica a OX40L como un tratamiento potente para el linfoma de linfocitos B y otros tipos de cáncer.

Se han identificado muchas moléculas que promueven la generación de linfocitos Tr1, como IL-10, IFN- α , ICOSL y compuestos inmunosupresores tales como Dex más vit. D3. OX40L representa un potente inhibidor para la generación de linfocitos Tr1 no sólo a partir de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados, sino también a partir de linfocitos T CD4⁺ de memoria y linfocitos T reguladores. Esta novedosa propiedad de OX40/OX40L puede explicar un informe reciente que muestra que la señalización de OX40 permite a los linfocitos T autorreactivos anérgicos adquirir funciones de células efectoras. El tratamiento dirigido a OX40/OX40L proporciona por lo tanto la posibilidad de tratar enfermedades alérgicas y autoinmunes humanas y así como enfermedades humanas infecciosas y cáncer, incluyendo pero no limitado a melanoma, cáncer de cerebro, cáncer de huesos, una leucemia, un linfoma, neoplasia derivada de células epiteliales (carcinoma epitelial) tal como carcinoma de células basales, adenocarcinoma, cáncer gastrointestinal tal como cáncer de labio, cáncer de boca, cáncer de esófago, cáncer de intestino delgado y cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer de piel, tal como cánceres espinocelular y de células basales, cáncer de próstata, carcinoma de células renales y otros cánceres conocidos.

Los trastornos o afecciones que pueden prevenirse o tratarse por los anticuerpos y procedimientos descritos en la presente invención incluyen la prevención o el tratamiento de cáncer, tal como leucemia cutánea de linfocitos T, tumores de cabeza y cuello, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, gliomas de alto grado, metástasis cerebral, melanoma, cáncer de piel, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, leucemia, síndrome mielodisplásico (una afección preleucémica) y mieloma múltiple. En general, la metástasis de cualquier tipo de cáncer puede prevenirse o tratarse con los compuestos y procedimientos descritos en el presente documento. Los anticuerpos también pueden usarse para prevenir o tratar afecciones angiogénicas proliferativas incluyendo telangiectasia, angiomas venosos, hemangioblastoma. Otros trastornos, enfermedades o afecciones incluyen enfermedades víricas, algunas de las cuales tradicionalmente pueden considerarse "intratables". Los

anticuerpos, por ejemplo, también se pueden usar para clasificar las cepas de un solo patógeno. Los investigadores pueden utilizar los anticuerpos descritos en el presente documento para identificar y rastrear células o moléculas específicas en un organismo.

5 De forma general, los términos "cáncer" y "canceroso" hacen referencia o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por crecimiento celular no regulado. Más específicamente, los cánceres que pueden tratarse o prevenirse usando uno cualquiera o más de los anticuerpos descritos en el presente documento o una variante de los mismos, incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Los ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen, pero no se limitan a, carcinoma espinocelular, cáncer de pulmón (incluyendo carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma pulmonar no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso de pulmón), cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago (incluyendo cáncer gastrointestinal y cáncer del estroma gastrointestinal), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer del cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello, melanoma, melanoma de extensión superficial, melanoma lentigo maligno, melanomas lentiginosos acrales, melanomas nodulares, así como linfoma de linfocitos B (incluyendo linfoma no de Hodgkin de bajo grado/folicular (NHL); NHL linfocítico pequeño (SL); NHL de grado intermedio/folicular; NHL difuso de grado intermedio; NHL inmunoblástico de alto grado; NHL linfoblástico de alto grado; NHL de células pequeñas no hendidas de alto grado; NHL con enfermedad voluminosa; linfoma de células del manto; linfoma relacionado con el SIDA; y macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); tricoleucemia; leucemia mieloblástica crónica y trastorno linfoproliferativo posttrasplante (PTLD), así como la proliferación vascular anormal asociada a la facomatosis, edema (como el asociado a los tumores cerebrales) y el síndrome de Meigs.

25 También se proporcionan en el presente documento procedimientos para tratar o prevenir un trastorno inmune. . Estos procedimientos comprenden administrar una cantidad eficaz del anticuerpo a un sujeto necesitado de dicho tratamiento. En algunas realizaciones, el trastorno inmune es un trastorno inmune o un trastorno autoinmune. El trastorno es asma, dermatitis atópica, rinitis alérgica, enfermedad inflamatoria del intestino, esclerosis múltiple, GVHD y/o lupus sistémico eritematoso. En algunas realizaciones, el trastorno es una enfermedad asociada a un virus, bacteria u otro agente infeccioso.

30 Además, los anticuerpos y procedimientos que se describen en el presente documento se pueden usar para prevenir o tratar enfermedades y afecciones inflamatorias, tales como osteoartritis, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedades autoinmunes, tales como lupus y enfermedad autoinmune mixta. Por ejemplo, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser útiles en el tratamiento de una variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo a un sujeto que lo necesite, en el que la enfermedad autoinmune o enfermedad inflamatoria es una cualquiera o más de las siguientes enfermedades: diabetes sacarina insulino dependiente (IDDM), diabetes sacarina, esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmune experimental, encefalomiелitis diseminada aguda, artritis, artritis reumatoide, artritis autoinmune experimental, miastenia grave, tiroiditis, enfermedad de Hashimoto, mixedema primario, tirotoxicosis, anemia perniciosa, gastritis autoinmune atrófica, enfermedad de Addison, menopausia prematura, infertilidad masculina, diabetes juvenil, síndrome de Goodpasture, pénfigo vulgar, penfigoide, oftalmía simpática, uveítis facogénica, anemia hemolítica autoinmune, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis crónica activa Hb_{s-ve}, cirrosis criptogénica, colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren, escleroderma, granulomatosis de Wegener, poli/dermatomiositis, LE discoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, psoriasis, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, anemia aplásica, hepatitis autoinmune, enfermedad celíaca, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré (GBS), púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome de opsoclono-mioclono (OMS). Neuritis óptica, tiroiditis de Ord, pénfigo, poliartritis, cirrosis biliar primaria, síndrome de Reiter, enfermedad de Takayasu, arteritis temporal, anemia hemolítica autoinmune por anticuerpos calientes, granulomatosis de Wegener, alopecia universal, enfermedad de Behçet, enfermedad de Chagas. Síndrome de fatiga crónica, disautonomía, endometriosis, hidradenitis supurativa, cistitis intersticial, neuromiotonía, sarcoidosis, esclerodermia, colitis ulcerosa, vitiligo, vulvodinia, enfermedades inflamatorias de la piel, dermatitis de contacto alérgica, gastritis por *H. pylory*, enfermedad inflamatoria nasal crónica, arteriosclerosis y enfermedad del injerto contra el huésped.

55 Más específicamente, una "enfermedad autoinmune" tal como se usa en el presente documento es una enfermedad o trastorno que surge de y dirigido contra los propios tejidos u órganos de un individuo o un segregado o manifestación de los mismos o afección resultante de ello. La enfermedad autoinmune puede hacer referencia a una afección que resulta de, o se agrava por, la producción por linfocitos B de anticuerpos que son reactivos con los tejidos y los antígenos normales del cuerpo. Además, una enfermedad autoinmune es una que puede implicar la secreción de un autoanticuerpo que es específico de un epítipo de un autoantígeno (por ejemplo un antígeno nuclear).

60 Las enfermedades o trastornos autoinmunes que se pueden tratar y/o prevenir mediante uno cualquiera o más de los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, artritis (artritis reumatoide, como artritis aguda, artritis reumatoide crónica, gota o artritis gotosa, artritis gotosa aguda, artritis inmunológica aguda,

artritis inflamatoria crónica, artritis degenerativa, artritis inducida por colágeno de tipo II, artritis infecciosa, artritis de Lyme, artritis proliferativa, artritis psoriásica, enfermedad de Still, artritis vertebral y artritis reumatoide de inicio juvenil, artrosis, artritis crónica progresiva, artritis deformante, poliartritis crónica primaria, artritis reactiva, y espondilitis anquilosante), enfermedades de la piel hiperproliferativas inflamatorias, psoriasis, tales como psoriasis en placas, psoriasis en gotas, psoriasis pustulosa y psoriasis de las uñas, atopia incluyendo enfermedades atópicas tales como fiebre del heno y síndrome de Job, dermatitis incluyendo dermatitis de contacto, dermatitis de contacto crónica, dermatitis exfoliativa, dermatitis alérgica, dermatitis de contacto alérgica, dermatitis herpetiforme, dermatitis numular, dermatitis seborreica, dermatitis no específica, dermatitis de contacto irritante primaria y dermatitis atópica, síndrome de hiper-IgM ligado al cromosoma X, enfermedades inflamatorias intraoculares alérgicas, urticarias, tales como urticaria alérgica crónica y urticaria idiopática crónica, incluyendo urticaria crónica autoinmune, miositis, polimiositis/dermatomiositis, dermatomiositis juvenil, necrólisis epidérmica tóxica, esclerodermia (incluyendo esclerodermia sistémica), esclerosis, como esclerosis sistémica, esclerosis múltiple (MS) como MS espino-óptica, MS primaria progresiva (PPMS) y EM remitente recidivante (RRMS), esclerosis sistémica progresiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, esclerosis diseminada, esclerosis atáxica, neuromielitis óptica (NMO),

5 enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) (por ejemplo, enfermedad de Crohn, enfermedades gastrointestinales autoinmunes, colitis tales como colitis ulcerativa, colitis ulcerosa, colitis microscópica, colitis colagenosa, colitis poliposa, enterocolitis necrosante, colitis transmural y enfermedad inflamatoria autoinmune del intestino), inflamación intestinal, pioderma gangrenoso, eritema nodoso, colangitis esclerosante primaria, síndrome de dificultad respiratoria, incluyendo síndrome de dificultad respiratoria del adulto o agudo (ARDS), meningitis, inflamación de toda o parte de la úvea, iritis, coroiditis, un trastorno hematológico autoinmune, espondilitis reumatoide, sinovitis reumatoide, angioedema hereditario, daño a los nervios craneales como en la meningitis, herpes gestacional, penfigoide gestacional, prurito de escroto, insuficiencia ovárica prematura autoinmune, pérdida repentina de la audición debida a una afección autoinmune, enfermedades mediadas por IgE tales como anafilaxia y rinitis alérgica y atópica, encefalitis, tales como la encefalitis de Rasmussen y encefalitis límbica y/o del tronco encefálico, uveítis, tales como uveítis anterior, uveítis anterior aguda, uveítis granulomatosa, uveítis no granulomatosa, uveítis faecoantigénica, uveítis posterior, o uveítis autoinmune, glomerulonefritis (GN) con y sin síndrome nefrótico como glomerulonefritis crónica o aguda tal como GN primaria, GN inmunomediada, GN membranosa (nefropatía membranosa), GN membranosa idiopática o nefropatía membranosa idiopática, GN membranoproliferativa o proliferativa membranosa (MPGN), incluyendo GN de tipo I y tipo II y rápidamente progresiva, nefritis proliferativa, insuficiencia endocrina poliglandular autoinmune, balanitis incluyendo balanitis circunscrita plasmocelular,

15 balanopostitis, eritema anular centrífugo, eritema discrómico persistente, eritema multiforme, granuloma anular, liquen nítido, liquen escleroso y atrófico, liquen simple crónico, liquen espinuloso, liquen plano, ictiosis lamelar, hiperqueratosis epidermolítica, queratosis premalignas, pioderma gangrenoso, afecciones y respuestas alérgicas, reacción alérgica, eccema, incluyendo eccema alérgico o atópico, eccema asteatósico, eccema dishidrótico, y eccema palmoplantar vesicular, asma, tal como asma bronquial, asma bronquial y asma autoinmune, afecciones que implican la infiltración de linfocitos T y respuestas inflamatorias crónicas, reacciones inmunitarias contra antígenos extraños, tales como los grupos de sangre fetales ABO durante el embarazo, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, miocarditis autoinmune, deficiencia de adhesión de los leucocitos, lupus, incluyendo lupus nefrítico, lupus cerebral, lupus pediátrico, lupus no renal, lupus extrarrenal, lupus discoide y lupus eritematoso discoide, lupus alopecico, lupus eritematoso sistémico (SLE), tal como SLE cutáneo o SLE cutáneo subagudo, síndrome de lupus neonatal (NLE) y lupus eritematoso diseminado, diabetes sacarina de inicio juvenil (de tipo I), incluyendo diabetes sacarina insulino dependiente (IDDM) pediátrica, diabetes sacarina de inicio en adulto (diabetes de tipo II), diabetes autoinmune, diabetes insípida idiopática, retinopatía diabética, nefropatía diabética, trastorno diabético de las grandes arterias, respuestas inmunitarias asociadas con hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, tuberculosis, sarcoidosis, granulomatosis, incluyendo granulomatosis linfomatoide, granulomatosis de Wegener, agranulocitosis, vasculitis, incluyendo vasculitis, vasculitis de grandes vasos (incluyendo polimialgia reumática y arteritis de células gigantes (de Takayasu)), vasculitis de vasos medianos (incluyendo enfermedad de Kawasaki y poliarteritis nodosa/periarteritis nodosa), poliarteritis microscópica, inmunovasculitis, vasculitis del SNC, vasculitis cutánea, vasculitis por hipersensibilidad, vasculitis necrosante como la vasculitis sistémica necrosante, y vasculitis asociadas a ANCA, tales como vasculitis o síndrome de Churg-Strauss (CSS) y vasculitis de vasos pequeños asociada a ANCA, arteritis temporal, anemia aplásica, anemia aplásica autoinmune, anemia positiva de Coombs. Anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica o anemia hemolítica inmunitaria incluyendo anemia hemolítica autoinmune (AIHA), anemia perniciososa (anemia perniciososa), enfermedad de Addison, anemia o aplasia pura de glóbulos rojos (PRCA), deficiencia de factor VIII, hemofilia A, neutropenia autoinmune, pancitopenia, leucopenia, enfermedades que implican diapedesis leucocitaria, trastornos inflamatorios del SNC, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, síndromes de lesión orgánica múltiple tales como los derivados de septicemia, traumatismo o hemorragia, enfermedades mediadas por complejos de antígeno-anticuerpo, enfermedad antimembrana basal glomerular, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, neuritis alérgica, enfermedad/síndrome de Behçet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjögren, síndrome de Stevens-Johnson, penfigoide tales como penfigoide ampollar y penfigoide cutáneo, pénfigo (incluyendo pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, pénfigo de penfigoide mucocomembranoso y pénfigo eritematoso), poliendocrinopatías autoinmunes, enfermedad o síndrome de Reiter, lesión térmica, preeclampsia, un trastorno por complejo inmunitario tal como nefritis por complejo inmunitario, nefritis mediada por anticuerpos, polineuropatías, neuropatía crónica, como polineuropatías de IgM o neuropatía mediada por IgM, trombocitopenia (como la desarrollada por los pacientes

35
40
45
50
55
60

- con infarto de miocardio, por ejemplo), incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), púrpura postransfusión (PTP), trombocitopenia inducida por heparina y trombocitopenia autoinmune o inmunomediada tal como púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), incluyendo PTF crónica o aguda, escleritis como queratoescleritis idiopática, epiescleritis, enfermedad autoinmunitaria del testículo y el ovario incluyendo orquitis y ovaritis autoinmunes, hipotiroidismo primario, hipoparatiroidismo, enfermedades endocrinas autoinmunes incluyendo tiroiditis tales como tiroiditis autoinmune, enfermedad de Hashimoto, tiroiditis crónica (tiroiditis de Hashimoto), o tiroiditis subaguda, enfermedad tiroidea autoinmune, hipotiroidismo idiopático. Enfermedad de Grave, síndromes poliglandulares tales como síndromes poliglandulares autoinmunes (o síndromes de endocrinopatía poliglandular), síndromes paraneoplásicos, incluyendo síndromes paraneoplásicos neurológicos como síndrome miasténico de Lambert-Eaton o síndrome de Eaton-Lambert, síndrome del hombre rígido o síndrome de la persona rígida, encefalomiелitis como encefalomiелitis alérgica y encefalomiелitis alérgica experimental (EAE), miastenia grave, como miastenia grave asociada a timoma, degeneración cerebelosa, neuromiotonía, síndrome de opsoclonu u opsoclonomioclonu (OMS) y neuropatía sensorial, neuropatía motora multifocal, síndrome de Sheehan, hepatitis autoinmune, hepatitis crónica, hepatitis lupoide, hepatitis de células gigantes, hepatitis activa crónica o hepatitis activa crónica autoinmune, neumonitis intersticial linfoide (LIP), bronquiolitis obliterante (sin trasplante) frente a NSIP, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Berger (nefropatía por IgA), nefropatía idiopática por IgA, dermatosis por IgA lineal, dermatosis neutrofílica febril aguda, dermatosis pustulosa subcorneal, dermatosis acantolítica transitoria, cirrosis como cirrosis biliar primaria y neumonocirrosis, síndrome de enteropatía autoinmune, enfermedad celíaca o enfermedad celíaca, esprúe celíaco (enteropatía por gluten), esprúe resistente, esprúe idiopático, crioglobulinemia, esclerosis lateral amiotrófica (ALS; enfermedad de Lou Gehrig), enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad autoinmune del oído como la enfermedad autoinmune del oído interno (AIED), pérdida de la audición autoinmune, policondritis como policondritis resistente o en recidiva o recidivante, proteinosis alveolar pulmonar, síndrome de Cogan/queratitis intersticial no sifilítica,
- parálisis de Bell, enfermedad/síndrome de Sweet, rosácea autoinmune, dolor asociado a zóster, amiloidosis, una linfocitosis no cancerosa, una linfocitosis primaria, que incluye linfocitosis de linfocitos B monoclonales (por ejemplo, gammapatía monoclonal benigna y gammapatía monoclonal de significado incierto, MGUS), neuropatía periférica, síndrome paraneoplásico, canalopatías tales como epilepsia, migraña, arritmias, trastornos musculares, sordera, ceguera, parálisis periódica y canalopatías del SNC, autismo, miopatía inflamatoria, glomeruloesclerosis focal o segmentaria o focal y segmentaria (FSGS), oftalmopatía endocrina, uveorretinitis, coriorretinitis, trastorno de hepatológico autoinmune, fibromialgia, insuficiencia endocrina múltiple, síndrome de Schmidt, adrenalitis, atrofia gástrica, demencia presenil, enfermedades desmielinizantes tales como enfermedades autoinmunes desmielinizantes y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Dressler, alopecia areata, alopecia total, síndrome de CREST (calcinosis, fenómeno de Raynaud, dismotilidad esofágica, esclerodactilia y telangiectasia), infertilidad autoinmune masculina y femenina, por ejemplo, debido a anticuerpos antiespermatozoides, enfermedad mixta del tejido conectivo, enfermedad de Chagas, fiebre reumática, aborto recurrente, pulmón de granjero, eritema multiforme, síndrome poscardiotomía, síndrome de Cushing, pulmón de los criadores de pájaros, angiitis granulomatosa alérgica, angiitis linfocítica benigna, síndrome de Alport, alveolitis como alveolitis alérgica y alveolitis fibrosante, enfermedad pulmonar intersticial, reacción a la transfusión, lepra, malaria, enfermedades parasitarias como leishmaniasis, kpanosomiasis, esquistosomiasis, ascariasis, aspergilosis, síndrome de Sampter, síndrome de Caplan, dengue, endocarditis, fibrosis endomiocárdica, fibrosis pulmonar intersticial difusa, fibrosis pulmonar intersticial, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, endoftalmitis, eritema elevatum diutinum, eritroblastosis fetal, fascitis eosinofílica, síndrome de Shulman, síndrome de Felty, flariasis, ciclitis como ciclitis crónica, ciclitis heterocrónica, iridociclitis (aguda o crónica) o ciclitis de Fuch, púrpura de Henoch-Schönlein,
- infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), SCID, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS), infección por ecovirus, sepsis, endotoxemia, pancreatitis, tiroxicosis, infección por parvovirus, infección por el virus de la rubéola, síndromes después de la vacunación, infección de rubéola congénita, infección por el virus de Epstein-Barr, paperas, síndrome de Evan, insuficiencia gonadal autoinmune, corea de Sydenham, nefritis postestreptocócica, tromboangeítis obliterante, tirotoxicosis, tabes dorsal, corioiditis, polimialgia de células gigantes, neumonitis por hipersensibilidad crónica, queratoconjuntivitis seca, queratoconjuntivitis epidémica, síndrome nefrótico idiopático, nefropatía de cambios mínimos, lesión familiar benigna e isquemia por reperfusión, reperfusión en trasplante de órganos, autoinmunidad de la retina, inflamación de las articulaciones, bronquitis, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias/pulmonar, silicosis, aftas, estomatitis aftosa, trastornos arterioscleróticos, aspermiogénesis, hemólisis autoinmune, enfermedad de Boeck, crioglobulinemia, contractura de Dupuytren, oftalmía final facoanafiláctica, enteritis alérgica, eritema nudoso leproso, parálisis facial idiopática, síndrome de fatiga crónica, fiebre reumática, enfermedad de Haniman-Rich, pérdida de audición neurosensorial, hemoglobinuria paroxística, hipogonadismo, ileítis regional, leucopenia, mononucleosis infecciosa, mielitis transversal, mixedema primario idiopático, nefrosis, oftalmía simpática, orquitis granulomatosa, pancreatitis, polirradiculitis aguda, pioderma gangrenoso, tiroiditis de Quervain, atrofia esplénica adquirida, timoma no maligno, vitiligo, síndrome de choque tóxico, intoxicación alimentaria, afecciones que implican la infiltración de linfocitos T, deficiencia de adhesión de leucocitos, respuestas inmunitarias asociadas a la hipersensibilidad aguda y retardada mediada por citocinas y linfocitos T, enfermedades que implican diapédesis leucocitaria, síndrome de lesión orgánica múltiple, enfermedades mediadas por complejos de antígeno-anticuerpo, enfermedad por anticuerpos antimembrana basal glomerular, neuritis alérgica, poliendocrinopatías autoinmunes, ovaritis, mixedema primario, gastritis atrófica autoinmune,

oftalmía simpática, enfermedades reumáticas, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome nefrótico, insulinitis, insuficiencia poliendocrina, síndrome poliglandular autoinmune de tipo I, hipoparatiroidismo idiopático del adulto (AOIH), miocardiopatía como miocardiopatía dilatada, epidermolísis ampollosa adquirida (EBA), hemocromatosis, miocarditis, síndrome nefrótico, colangitis esclerosante primaria, sinusitis purulenta o no purulenta, sinusitis aguda o crónica, sinusitis de etmoides, frontal, maxilar o esfenoidal, un trastorno relacionado con eosinófilos, tales como eosinofilia, eosinofilia por infiltración pulmonar, síndrome de eosinofilia-mialgia,

síndrome de Löffler, neumonía eosinofílica crónica, eosinofilia pulmonar tropical, aspergilosis bronconeumónica, aspergiloma, o granulomas que contienen eosinófilos, anafilaxis, espondiloartritis seronegativas, enfermedad autoinmune poliendocrina, colangitis esclerosante, escleritis, epiescleritis, candidiasis mucocutánea crónica, síndrome de Bruton, hipogammaglobulinemia transitoria de la infancia, síndrome de Wiskott-Aldrich, síndrome de ataxia-telangiectasia, angiectasia, trastornos autoinmunes asociados a la enfermedad del colágeno, reumatismo, enfermedad neurológica, linfadenitis, reducción de la respuesta de la tensión arterial, disfunción vascular, lesión de los tejidos, isquemia cardiovascular, hiperalgesia, isquemia renal, isquemia cerebral y enfermedad de acompañamiento de vascularización, trastornos de hipersensibilidad alérgica, glomerulonefritis, lesión por reperfusión, trastornos de reperfusión isquémica, lesión por reperfusión de los tejidos de miocardio o de otro tipo, traqueobronquitis linfomatosa, dermatosis inflamatorias, dermatosis con componentes inflamatorios agudos, insuficiencia orgánica múltiple, enfermedades ampollosas, necrosis cortical renal, meningitis purulenta aguda u otros trastornos inflamatorios del sistema nervioso central, trastornos inflamatorios oculares y orbitales, síndromes asociados a la transfusión de granulocitos, toxicidad inducida por citocinas, narcolepsia, inflamación aguda grave, inflamación crónica intratable, pielitis, hiperplasia endarterial, úlcera péptica, valvulitis y endometriosis.

Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden tener una variedad de usos académicos, médicos y comerciales. Los anticuerpos se pueden usar en diferentes tipos de pruebas de diagnóstico, por ejemplo, para detectar una amplia variedad de enfermedades o la presencia de fármacos (productos farmacéuticos), toxinas u otras proteínas incluyendo las hormonas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser útiles en pruebas para detectar la enfermedad, por ejemplo, en el suero o la sangre de los pacientes. La enfermedad puede incluir enfermedades relacionadas con OX40 o enfermedades o indicaciones no relacionadas con OX40 incluyendo diversos tipos de cáncer, enfermedad inflamatoria o autoinmune. Los anticuerpos también se pueden usar en la radioinmunodetección y la radioinmunoterapia del cáncer, y algunos nuevos procedimientos de ensayo pueden utilizar estos anticuerpos descritos para actuar sólo en las membranas celulares de células de tipos específicos, es decir, cancerosas.

Los anticuerpos descritos en el presente documento podrían ser parte de un kit u otro paquete de diagnóstico. Por tanto, se proporciona en el presente documento un kit de diagnóstico, o artículo de fabricación, para usar con el procedimiento de pretratamiento descrito en la presente memoria. El kit de diagnóstico puede comprender uno cualquiera o más de lo siguiente: material de referencia antagonista/anticuerpo/fármaco; anticuerpo neutralizante de control positivo (preferiblemente de cabra o mono cangrejero); columna de proteína A + G (por ejemplo columna de proteína A/G); reactivo de deslipidación; tampón(es) de purificación por afinidad de inmunoglobulinas (por ejemplo, tampones de unión, elución y neutralización); suero de complemento; diluyente de ensayo para las células; manual de instrucciones o bibliografía; vial de células congeladas (por ejemplo, células WIL2); reactivo de marcaje de células (como CELL TITER GLO.RTM.), etc. A modo de ejemplo, el kit de diagnóstico puede incluir, pero no se limita a: (a) reactivo de deslipidación; (b) tampones (por ejemplo, tampones de unión y elución) para la purificación por afinidad de las inmunoglobulinas; y (c) manual de instrucciones que instruye al usuario del kit de diagnóstico para usar el kit para pretratar una muestra biológica de un sujeto con enfermedad autoinmune o cáncer antes de realizar un bioensayo basado en células (tal como un ensayo de anticuerpos neutralizantes) en la muestra (por ejemplo, para evitar el problema de interferencia del suero). El kit de diagnóstico comprende además opcionalmente uno cualquiera o más de: material de referencia de fármaco, control positivo de anticuerpo neutralizante, suero de complemento, diluyente de ensayo para las células, y reactivo de marcaje de células, etc.

Los anticuerpos y otros descubrimientos descritos en el presente documento también proporcionan procedimientos de cribado de alto rendimiento. Más específicamente, y como conocen los expertos en la técnica, se facilitan procedimientos de alto rendimiento para el cribado de anticuerpos monoclonales antagonistas o agonistas o moléculas pequeñas que se unen a receptores de OX40, y que pueden inhibir la generación y función de los linfocitos Tr1 o promover la generación y función de los linfocitos Tr1. En uno de dichos procedimientos, se transfirió una línea celular de linfocitos T humanos (SU-DHL-1) que tiene la capacidad de producir IL-10 con el gen de OX40 humano (SUOX40). Se cultivaron 100.000 células SUOX40 con 100.000 fibroblastos de ratón (células L) o 100.000 fibroblastos de ratón que expresan el ligando de OX40 humano (células L con ligando de OX40) en placas de 96 pocillos. Después de 48 horas de cultivo, se recogieron los sobrenadantes del cultivo para medir la IL-10 mediante un ELISA específico de IL-10. En un experimento representativo, 100.000 células SUOX40 produjeron hasta 6000 pg/ml de IL-10 cultivadas en ausencia de ligando de OX40. En presencia de ligando de OX40, las 100.000 células SUOX40 producían menos de 1000 pg/ml de IL-10. Este procedimiento de cultivo puede usarse para el cribado de, entre otras cosas, los anticuerpos monoclonales antagonistas o pequeñas moléculas que bloquean la capacidad del ligando de OX40 de inhibir la producción de IL-10 por las células SUOX40. Como alternativa, este procedimiento de cultivo puede modificarse sustituyendo las células L que expresan ligando de OX40 por anticuerpos monoclonales agonistas potenciales o pequeñas moléculas específicas de OX40 para determinar, entre otras cosas, su capacidad para inhibir la producción de IL-10 por las células SUOX40.

Los anticuerpos anti-OX40 descritos en el presente documento pueden usarse como un ensayo o en un ensayo para analizar o medir la actividad de un fármaco u otra molécula que se encuentra en un organismo o muestra orgánica. También podrían usarse en un ensayo cuantitativo para medir la cantidad de una sustancia en una muestra. Los bioensayos e inmunoensayos son algunas de las muchas variedades de ensayos bioquímicos especializados para los que podrían usarse estos anticuerpos. Los anticuerpos anti-OX40 revelados en el presente documento se pueden usar en otros ensayos para medir procesos tales como actividad enzimática, captura de antígeno, actividad de citoblastos y unión competitiva a proteína.

Se generaron células L que expresan GTR1, OX40L, 4-1BBL, ICOSL humanas mediante transducción mediada por retrovirus, tal como conocen los expertos en la técnica. En pocas palabras, se amplificó la secuencia de codificación de longitud completa de GTR1 (nº de acceso NM_005092), OX40L (nº de acceso NM_003326), 4-1BBL (nº de acceso NM_003811), ICOSL (nº de acceso NM_015259) humanas por RT-PCR con ARN preparado a partir de PBMC estimuladas con HSV-1. Posteriormente, los ADNc se clonaron en un vector retroviral pMIGW2 basado en MSCV y los plásmidos resultantes se verificaron mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ADN. Para producir retrovirus recombinante, se cotransfectó cada vector con los constructos de empaquetamiento pCL-gp (gag/pol) y pHCMV-VSVG (glicoproteína de cubierta de VSV) en células HEK293T. Dos días más tarde, los sobrenadantes de cultivo que contenían el virus se recolectaron y se usaron para infectar células L CD32 a un MOI de 100. Bajo esta condición, se transdujeron de manera productiva > 95 % de las células.

Se cultivaron monocitos CD14⁺ aislados (pureza > 94 %) en presencia de 100 ng/ml de GM-CSF y 50 ng/ml de IL-4 (ambos de R&D) durante 5 días, tal como conocen los expertos en la técnica. Las DC inmaduras resultantes se lavaron y se cultivaron durante 24 h con IFN- α (1000 U/ml, PBL Biomedical Laboratories), IL-10 (10 ng/ml, R&D) y células L transfectadas por CD40L irradiadas (relación de DC a células L, 4:1), obteniendo DC maduras, tal como conocen los expertos en la técnica.

Se aislaron linfocitos T CD4⁺ indiferenciados y linfocitos T CD4⁺ de memoria (cada uno de pureza > 99 %) a partir de PBMC usando CD4⁺ T cell Isolation Kit II (kit de aislamiento de linfocitos T CD4⁺ II) (Miltenyi Biotec) seguido por clasificación de células (fracción de CD4⁺ CD45RA⁺ CD45RO⁻ CD25⁻ como linfocitos T indiferenciados y fracción de CD4⁺ CD45RA⁻ CD45RO⁺ CD25⁻ como linfocitos T de memoria), tal como conocen los expertos en la técnica. Se cocultivaron 4x10⁴ linfocitos T CD4⁺ indiferenciados alogénicos recién purificados con DC inmaduras o cultivadas (relación de DC a T, 1:10) en presencia o ausencia de OX40L humano recombinante (R&D, 100 ng/ml) en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo redondo durante 7 días, tal como conocen los expertos en la técnica. Se cultivaron también los linfocitos T CD4⁺ purificados con IL-12 (10 ng/ml, R&D), IL-4 (25 ng/ml, R&D), o la combinación de dexametasona (5x10⁻⁸ M, Life Technologies) y 1-alfa,25-dihidroxitamina D3 (10⁻⁷ M) durante 7 días en presencia de anticuerpo monoclonal soluble anti-CD28 (CD28.2, 1 μ g/ml) e IL-2 (50 U/ml, I + D) en células L CD32/OX40L, células L CD32/GTR1-L, células L CD32/4-1BBL-L irradiadas o células CD32-L parentales que se habían prerrecubierto con anticuerpo monoclonal anti-CD3 (OKT3, 0,2 μ g/ml) en placas de cultivo de 48 pocillos (relación entre linfocitos T y células L, 2,5: 1), tal como conocen los expertos en la técnica. En algunos experimentos, se cultivaron los linfocitos T CD4⁺ durante 7 días en las células L CD32, en la mezcla de células L CD32 y CD32/ICOSL (relación 1: 1), o en una mezcla de células L CD32/ICOSL y células L CD32/OX40L (relación 1:1) prerrecubiertas con anticuerpo monoclonal anti-CD3 (0,2 μ g/ml) en placas de cultivo de 48 pocillos, tal como conocen los expertos en la técnica. Se usó RPMI 1640 y se complementó con FCS al 10 %, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, penicilina G y estreptomina para los cultivos, como conocen los expertos en la técnica.

Se recogieron los linfocitos T cultivados y se lavaron, y luego se reestimularon con anticuerpo anti-CD3 (5 μ g/ml) unido a las placas y anti-CD28 (2 μ g/ml) soluble a una concentración de 1x10⁵ células/ml durante 24 h, como conocen los expertos en la técnica. Los niveles de IL-4, IL-10, TNF- α , y IFN- α en los sobrenadantes se midieron por ELISA (todos los kits de R&D), tal como conocen los expertos en la técnica. Para la producción intracelular de citocinas, los linfocitos T cultivados se reestimularon con 50 ng/ml de PMA más 2 μ g/ml de ionomicina durante 6 h. Se añadió brefeldina A (10 μ g/ml) durante las últimas 2 h, tal como conocen los expertos en la técnica. Las células se tiñeron con una combinación de anticuerpos monoclonales marcados con PE anti-IL-4 o anti-TNF- α o anticuerpos monoclonales marcados con FITC anti-IFN- α y anti-IL-10 marcados con ACP (todos de BD) usando el kit FIX y PERM (CALTAG), tal como conocen los expertos en la técnica.

Se recogieron los linfocitos T y resuspendieron en un medio que contiene EDTA para disociar los agrupamientos, como conocen los expertos en la técnica. Las células viables se contaron mediante exclusión con azul de tripano de las células muertas, como conocen los expertos en la técnica. Para el ensayo de la función supresora, se reestimularon a continuación linfocitos T CD4⁺ indiferenciados (A) y linfocitos Tr1 generados a partir de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados por anticuerpos monoclonales anti-CD3, anticuerpos monoclonales anti-CD28, IL-2, Dex, y vit D3 en presencia de células L parentales (B) o células L con OX40L (C), estos tres tipos de células y sus mezclas a una relación de 1:1, durante 5 días mediante cultivo en presencia de anticuerpo monoclonal anti-CD3 5 μ g/ml y anticuerpo monoclonal anti-CD28 1 μ g/ml, tiempo después del cual se evaluó la proliferación celular mediante la incorporación de [³H]-timidina, como conocen los expertos en la técnica.

Generación de anticuerpos monoclonales anti-OX40 humano específicos

Hemos generado varios anticuerpos monoclonales agonistas de ratón contra OX40 humano. Se confirmó la

especificidad de unión a antígeno de los anticuerpos mediante citometría de flujo (FIG. 10-12). Se validó la actividad agonista de los anticuerpos mediante ensayos funcionales. Se encontró que nueve de los 20 anticuerpos específicos anti-OX40 podían bloquear la generación de linfocitos T_H1 mediada por vitamina D3/dexametasona a partir de linfocitos T CD4⁺ (FIG. 13), potenciar la proliferación de linfocitos T CD4⁺ (FIG. 14), y suprimir la producción de IL-10 por Treg ICOS⁺ CD4⁺ CD25^{alto} FOXP3⁺ (FIG. 16). Se titularon los anticuerpos y se encontró que cinco poseían una actividad potente de supresión de la generación de linfocitos T_H1 a concentraciones de tan solo 4 ng/ml (FIG. 15).

Los anticuerpos de OX40 inhiben la función de los Treg CD4⁺ CD25^{alto}FOXP3⁺

Algunos de los anticuerpos monoclonales de OX40 inhiben la función supresora de los Treg FOXP3⁺ (FIG. 17). De los cinco anticuerpos (119-8B, 119-43, 119-122, 119-173B, y 106-222) que inhiben potentemente la producción de IL-10 a partir de linfocitos T_H1 y Treg CD4⁺ CD25^{alto} CD127⁻ FOXP3⁺, tres (119-43, 119-122, y 106-222) eran potentes en el bloqueo de la función de Treg CD4⁺ CD25^{alto} CD127⁻FOXP3⁺ (FIG. 17), sin embargo, dos (119-33 y 120-140A) de los 11 anticuerpos que no tienen actividad frente a la producción de IL-10, bloquean sin embargo la función de Treg CD4⁺ CD25^{alto} FOXP3^{alto} (FIG. 18).

Anticuerpos monoclonales anti-OX40 humano

La generación de anticuerpos monoclonales anti-OX40 humano se llevó a cabo, por ejemplo, mediante la inmunización de ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad con una línea celular de ratón transfectada con OX40 humano siguiendo los protocolos establecidos. Se establecieron y analizaron adicionalmente los clones de hibridoma que secretaban anticuerpo monoclonal que teñía específicamente las células OX40⁺.

Se diseñó un cribado exhaustivo para detectar los clones que desencadenan la señalización de OX40 (es decir, anticuerpos agonistas) mediante la inhibición de la generación y la función de los linfocitos T_H1. Esos clones se purificaron adicionalmente. Los anticuerpos agonistas contra hOX40 pueden ser humanizados y usarse en protocolos clínicos para terapia antitumoral humana, ya sea solos o en combinación con vacunación antitumoral y otros adyuvantes. Varios tipos de tumores diferentes podrían ser el blanco de estos anticuerpos, incluyendo melanoma, linfoma y cáncer de mama.

En otra realización, se usaron ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad para inmunización en la almohadilla de la pata o subcutánea. Cada ratón se inyectó con 5 millones de células L murinas transfectadas con OX40 humano (L-OX40) 6 veces a intervalos de 3 días. Tres días después de la sexta inyección, los ratones se sacrificaron y se retiraron los ganglios linfáticos poplíteos (cuando la inmunización fue en la almohadilla de la pata) o el bazo (cuando la inmunización fue subcutánea) y se fusionaron las células con células de mieloma SP2.0 o de mieloma NSO en una relación de 1 a 1 para generar clones de hibridoma usando protocolos establecidos. Los clones de hibridoma que secretaban anticuerpo monoclonal se cribaron para determinar la especificidad de unión a las células L-hOX40 mediante ensayos ELISA. Los sobrenadantes de hibridoma que se unían a las células L-hOX40 y no a las células L parentales se analizaron además para determinar la unión a las células L-hOX40 y SUPM2-L-hOX40 por citometría de flujo,

En el experimento de la FIG. 10, se cribaron sobrenadantes de hibridoma de hOX40 contra L-hOX40 frente a células L parentales por ELISA. Se seleccionaron veinte anticuerpos monoclonales específicos de hOX40. Se recubrieron veinte millones de células L o células L que expresan OX40 humano (L-hOX40) sobre una placa de 96 pocillos mezclando las células con cloruro de magnesio y calcio al 0,01 % en PBS y se dejó que secaran durante la noche en una campana de flujo laminar. Las placas se congelaron entonces a -20 °C durante al menos un día antes de su uso. Para los ensayos de unión a anticuerpos, se rehidrataron las células congeladas con PBS y se lavaron con tampón de lavado que contenía PBS más 0,05 % de Tween 20, y se bloquearon con BSA al 2 % en tampón de lavado. Se usaron entonces las células acondicionadas para determinar la unión a los sobrenadantes de los anticuerpos anti-OX40. Se detectó entonces la unión de los anticuerpos a las células con un anticuerpo secundario, anti-fragmento Fc de la IgG de ratón conjugado con HRP. Los sobrenadantes de hibridoma específicos de hOX40 reconocen las células L que expresan OX40 pero no las células L parentales.

En el experimento de la FIG. 11, se cribaron anticuerpos monoclonales específicos de hOX40 por citometría de flujo. Se mezclaron un número igual (100k) de células L y L-hOX40 en tampón de FACS (FCS al 1 % /EDTA 2 mM/PBS) y se incubaron con 0,5 µg de anticuerpos purificados por FPLC (proteína A de HiTrap/tampón de elución Gentle Ag/Ab). Se lavaron entonces las células y se tiñeron con un anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón conjugado con PE. Dos picos indican tinción positiva y negativa por el anticuerpo monoclonal anti-hOX40. Un solo pico sugiere ausencia de unión o unión inespecífica de los anticuerpos. Se confirmaron veinte anticuerpos monoclonales específicos de hOX40 por citometría de flujo.

En el experimento de la FIG. 12, se confirmó la especificidad de los anticuerpos monoclonales anti-hOX40 mediante el uso de células SUPM2 que expresan hOX40 (SUPM2-hOX40). Se mezclaron un número igual (100k) de células SUPM2 y SUPM2-hOX40 en tampón de FACS (FCS al 1 %/EDTA 2 mM/PBS) y se usaron para determinar la unión al anticuerpo monoclonal anti-hOX40 como en la FIG. 11. La especificidad de unión de cada anticuerpo se analizó por citometría de flujo. Dos picos indican tinción positiva y negativa por el anticuerpo monoclonal anti-hOX40, mientras que un solo pico sugiere ausencia de unión o unión inespecífica de los anticuerpos. Se reconfirmaron

veinte anticuerpos monoclonales específicos de hOX40.

En el experimento de la FIG. 13, se ha tratado de identificar anticuerpos monoclonales específicos de OX40 humano que puedan inhibir la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ estimulados por VitD₃ (10 micromoles mM)/Dex (50 nanoM), CD32L/ICOSL y anti-CD3/CD28 (0,2 microgramos/ml). Se añadieron anticuerpos monoclonales anti-hOX40 el día 0 de cultivo celular y se sometieron los linfocitos T CD4⁺ después de 7 días de estimulación a tinción intracelular de IL-10 seguida de análisis por citometría de flujo. Se muestran los datos representativos de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) en A. Y se muestran los porcentajes de linfocitos Tr1 para todos los tratamientos de anticuerpos monoclonales anti-hOX40 en B. Usando células obtenidas a partir de este experimento, se ha tratado de identificar anticuerpos monoclonales específicos de hOX40 que estimulen la proliferación de linfocitos T CD4⁺ (FIG. 14, las células se contaron el día 7 después de la estimulación) e inhiban la generación de Tr1 a partir de CD4⁺ (FIG. 13).

Con el fin de identificar dichos anticuerpos monoclonales de hOX40 por su capacidad para inhibir la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺, se generaron linfocitos Tr1 y se cultivaron como se describe en los experimentos de la FIG. 13 anteriormente. Se muestran los datos representativos de FACS en A y se muestra el porcentaje de linfocitos Tr1 después del tratamiento con nueve anticuerpos monoclonales anti-hOX40 en B. Cinco anticuerpos monoclonales específicos de hOX40 inhibían fuertemente la generación de linfocitos Tr1 a una concentración de 4 ng/ml (FIG. 15).

En el experimento de las FIG. 16A, 16B, y 16C, se estimularon linfocitos T ICOS⁺ CD4⁺ CD127⁻CD25^{alto} recién clasificados con anti-CD3 (0,2 µg/ml) en presencia de células CD32L/ICOSL y células CD32L/hOX40L o anticuerpos monoclonales anti-hOX40 o anticuerpo de control durante 5 días. Se contaron entonces las células y se reestimularon 5×10^4 células con anti-CD3/CD28 durante 24 horas y se ensayó en los sobrenadantes la secreción de IL-10 con un kit de Elisa. Se identificaron los anticuerpos monoclonales específicos de hOX40 que inhiben la generación de Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ y también inhiben la producción de IL-10 a partir de linfocitos T ICOS⁺CD4⁺CD25^{alto} naturalmente. Se cultivaron Treg ICO⁺ICOS⁻CD4⁺CD127⁻CD25^{altos} recién clasificados marcados con linfocitos CD4⁺CD25^{bajo} marcados con CFSE en presencia de monocitos irradiados y mAb anti-CD3 (0,3 µg/ml) y anti-hOX40. Después de 3,5 días de cultivo, se valoró la proliferación celular por dilución de CFSE en las células por FACS (FIG. 16C).

Las FIG. 17 A y 17B muestran la identificación de anticuerpos monoclonales anti-hOX40 que inhiben la generación de linfocitos Tr1 y bloquean la función de Treg FGXP3⁺CD4⁺CD25^{alto}. Se cultivaron linfocitos T FOXP3⁺ CD4⁺ CD127⁻ CD25^{alto} ($3,5 \times 10^4$) con células CD4⁺ CD25^{bajo} marcadas con CFSE (7×10^4) en presencia de monocitos irradiados (7×10^4 , 6000 rad) y 0,3 µg/ml de anticuerpos anti-CD3 y diversas concentraciones de anticuerpo monoclonal anti-hOX40. Después de 3 a 4 días de cultivo, se valoró la proliferación celular por dilución del CFSE en las células mediante análisis de citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células divididas. Se muestran los análisis representativos de citometría de flujo en la FIG. 17A. Se muestran los datos de 6 anticuerpos monoclonales en la FIG. 17B.

En el experimento de la FIG. 18, se cultivaron linfocitos T FOXP3⁺ CD4⁺ CD127⁻ CD25^{alto} ($3,5 \times 10^4$) con células CD4⁺ CD25^{bajo} marcadas con CFSE (7×10^4) en presencia de monocitos irradiados (7×10^4 , 6000 rad) y 0,3 µg/ml de anticuerpos anti-CD3 y diversas concentraciones de anticuerpo monoclonal anti-OX40. Después de 3 a 4 días de cultivo, se valoró la proliferación celular por dilución de tinte CFSE en las células por FACS. Los datos son representativos de dos experimentos. Se identificaron anticuerpos monoclonales anti-hOX40 que no inhiben la generación de Tr1 pero bloquean la función de Treg FOXP3⁺CD4⁺CD25^{alto}.

En el experimento de las FIG. 19A y 19B, se cultivaron linfocitos T CD4⁺CD25^{alto} derivados de linfoma con linfocitos CD4⁺ CD25^{bajo} marcados con CFSE (7×10^4) aislados de donantes sanos en presencia de monocitos alogénicos irradiados (7×10^4 , 6000 rad) y 0,3 microgramos/ml de anticuerpo anti-CD3 y 25 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-hOX40. Después de 3 a 4 días de cultivo, se valoró la proliferación celular por dilución de CFSE por FACS. Se muestran los análisis de FACS representativos en la FIG. 19A y se muestran los datos para todos los experimentos en la FIG. 19B. Se ha descubierto que los anticuerpos agonistas de hOX40 bloquean la función de los Treg CD4⁺CD25^{alto} derivados de linfoma.

La FIG. 20 muestra la identificación de anticuerpos agonistas de OX40 que se unen específicamente a OX40 humano y de rhesus. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica de Rhesus por centrifugación de Ficoll. Se obtuvieron linfocitos T CD4⁺ por microperlas de CD4. Se estimularon linfocitos T CD4⁺ con 10 µg/ml de lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA). Dos días después de la estimulación, las células se tiñeron con mAb anti-hOX40 seguido de anticuerpo de cabra contra IgG de ratón-APC y CD69-PE. 106-317 sirvió como control negativo. Se muestra que seis mAb anti-hOX40 que activan fuertemente la proliferación de linfocitos T podían unirse a linfocitos T CD4⁺ de Rhesus activados. Estos resultados indican que la toxicidad de estos seis anticuerpos monoclonales anti-hOX40 puede ensayarse en monos.

Sólo siete de 500 clones positivos anti-OX40 humano obtenidos usando los protocolos de fusión convencionales exhibieron las propiedades de activación de OX40, incluyendo, pero no limitado a, la capacidad de bloquear la generación de Tr1 que producen IL-10 y la función de supresión de nTreg como se divulga en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de anticuerpos monoclonales específicos de OX40

	Clon anticuerpo monoclonal	de	Bloqueo de IL-10	Bloqueo de nTreg
1	106-108		-	-
1	106-317		-	-
	106-107		-	-
4	106-148		-	-
5	119-204A		-	-
6	119-220C		-	+
	119-33A		-	+
8	119-58		-	+
9	119-181A		-	+
10	119-157A		-	+
11	120-140A		-	+
12	119-8B		+	-
13	119-173B		+	-
14	106-132		+	+
15	106-222		+	+
16	119-43		+	+
17	119-122		+	+
18	119-69A		+	+
19	120-56		+	+
20	120-270		+	+

Los clones de hibridoma 106-222 y 119-122 se seleccionaron sobre la base de tres criterios

1. Inhiben la generación de linfocitos Tr1 a partir de linfocitos T CD4⁺ (Treg inducible)
- 5 2. Revierten la función supresora de los linfocitos nTreg FOXP3⁺
3. Exhiben inhibición dependiente de la dosis de la desactivación de linfocitos Tr1 y reversión de la función de Treg FOXP3⁺

Anticuerpos quiméricos y humanizados

- 10 La humanización (también llamada remodelación o injerto de CDR) es una técnica establecida para la reducción de la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales a partir de fuentes xenogénicas (incluyendo pero no limitado a, roedores) y para la mejora de su activación del sistema inmunitario humano. Aunque es conocida la mecánica de la producción del anticuerpo monoclonal genomanipulado usando las técnicas de la biología molecular, el simple injerto de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de roedores en estructuras humanas no siempre reconstituye la afinidad de unión y la especificidad del anticuerpo monoclonal original.
- 15 Para humanizar un anticuerpo, el diseño del anticuerpo humanizado se convierte en el paso crítico en la reproducción de la función de la molécula original. Este diseño incluye diversas opciones: la extensión de las CDR, las regiones estructurales humanas a usar y la sustitución de los residuos procedentes del anticuerpo monoclonal de roedor en las regiones estructurales humanas (retromutaciones). Las posiciones de estas retromutaciones se han

identificado principalmente por análisis de secuencia/estructural o por análisis de un modelo de homología de la estructura 3D de las regiones variables.

Recientemente, se han usado colecciones en fagos para modificar los aminoácidos de las posiciones seleccionadas. Del mismo modo, se han usado muchos enfoques para elegir las estructuras humanas más apropiadas para injertar las CDR de roedores. Los primeros experimentos usaron un subconjunto limitado de anticuerpos monoclonales humanos bien caracterizados (a menudo, pero no siempre donde estaba disponible la estructura), independientemente de la identidad de las secuencias con el anticuerpo monoclonal de roedor (el llamado enfoque de región estructural fija). Algunos grupos usan regiones variables con alta identidad de las secuencias de aminoácido con las regiones variables de roedor (homología o mejor ajuste); otros usan secuencias de consenso o de línea germinal mientras que aún otros seleccionan fragmentos de las secuencias estructurales dentro de cada región variable de cadena ligera o pesada de varios anticuerpos monoclonales humanos diferentes. También hay enfoques para la humanización desarrollados que reemplazan los residuos de roedor en superficie por los residuos que se encuentran con mayor frecuencia en los anticuerpos monoclonales humanos ("remodelación de superficie" o "revestimiento") y los que usan diferentes definiciones de las extensiones de las CDR. Los anticuerpos humanizados se describen a continuación. Sin embargo, se describe también en el presente documento un anticuerpo quimérico que comprende las regiones variables pesadas y ligeras de SEC ID NO: 4 y 10, o SEQ ID NO: 16 y 22.

Los anticuerpos monoclonales humanizados se derivarán del anticuerpo anti-OX40 de murino.

El anticuerpo humanizado aislado anti-OX40 puede tener una CDR1 variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 13. El anticuerpo anti-OX 40 humanizado aislado puede tener una CDR2 variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 14. El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una CDR3 variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o 15.

El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una CDR1 variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o 19. El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una CDR2 variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 o 20. El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una CDR3 variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o 21.

El anticuerpo anti-OX40 humanizado puede tener una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o 23, o una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 por ciento de identidad con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o 23. El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o 17, o una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 por ciento de identidad con las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5 o 17.

El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una región variable de cadena ligera codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 12 o 24, o una secuencia de ácido nucleico con al menos un 90 por ciento de identidad con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o 24. El anticuerpo anti-OX40 humanizado aislado puede tener una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 6 o 18, o una secuencia de ácido nucleico con al menos un 90 por ciento de identidad con las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o 18.

40 **Expresión de anticuerpos anti-OX40 humanizados**

Un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención se puede preparar por expresión recombinante de genes de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas en una célula huésped. Para expresar un anticuerpo de forma recombinante, se transfecta una célula huésped con uno o más vectores de expresión recombinantes portadores de fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina del anticuerpo de tal forma que las cadenas ligeras y pesadas se expresan en la célula huésped y, preferiblemente, se secretan en el medio en el que se cultivan las células huésped, de cuyo medio se pueden recuperar los anticuerpos. Se usan metodologías de ADN recombinante estándares para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpos, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células huésped, tales como las descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds.), "Molecular Cloning; A Laboratory Manual", segunda edición, Cold Spring Harbor, NY, (1989), Ausubel, F. M. et al. (eds.) "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing Associates, (1989) y en la pat. de EE. UU. N° 4.816.397 de Boss *et al.*

Los anticuerpos y fragmentos y variantes de anticuerpos se pueden producir a partir de una variedad de células animales, preferiblemente de células de mamíferos, siendo preferidas en particular las células de murino y humanas. También, los sistemas de expresión de ADN recombinante podrían incluir los que utilizan células huésped y constructos de expresión que han sido diseñados para producir altos niveles de una proteína particular. Dichas células huésped y constructos de expresión pueden incluir *Escherichia coli*, que alberga constructos de expresión derivados de plásmidos o virus (bacteriófagos); levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* que albergan constructos de expresión episómicos o integrados cromosómicamente; células de insecto y virus tales

como células Sf9 y baculovirus y células de mamíferos que albergan constructos de expresión episómicos o integrados cromosómicamente (incluyendo pero no limitado a, retrovíricos) (dichos procedimientos, por ejemplo, se pueden ver en el manuscrito de Verma *et al.*, *J. Immunol. Methods* 216:165-181, 1998). Los anticuerpos también se pueden producir en plantas (dichos procedimientos, por ejemplo, pueden verse en la patente de los Estados Unidos. N° 6.046.037; Ma *et al.*, *Science* 268: 716-719, 1995) o mediante la tecnología de presentación en fagos (dichos procedimientos, por ejemplo, se pueden ver en Winter *et al.*, *Annu. Rev. Immunol* 12: 433-455, 1994).

Los anticuerpos anti-OX40 humano que presentaban un nivel de actividad y especificidad/afinidad de unión que son deseables pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante estándares, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, en genes de fragmentos Fab o en un gen de scFv. En estas manipulaciones, se liga operativamente un fragmento de ADN que codifica una VL o VH con otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un ligador flexible. La expresión "ligado operativamente", como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en fase.

En otro aspecto, el ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa ligando operativamente el ADN que codifica la VH con otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., *et al.* (1991) "Sequences of Immunological Interest", 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, n.º de publicación del NIH: 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que engloban estas regiones por amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante de IgG-1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD y cualquier variante alotípica de las mismas como se describe en Kabat (Kabat, E. A., *et al.* (1991) "Sequences of Immunological Interest", 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, n.º de publicación del NIH: 91-3242), pero más preferiblemente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica VH puede ligarse operativamente con otra molécula de ADN que codifica sólo la región constante de cadena pesada CH1.

Además, un anticuerpo humanizado unido a antígeno de superficie puede interactuar con las células portadoras de FcR. Dicha interacción puede desencadenar una función efectora tal como ADCC y/o potenciar la señalización debido a la reticulación mediada por Fc. La interacción puede ser beneficiosa o perjudicial para la terapia. Dichos efectos secundarios dañinos incluyen escalofríos, fiebre, hipotensión, y en algunos casos, disnea (Thistlethwaite JR., Cosimi AB, Delmonico FL, *et al.*).

Ciertos efectos perjudiciales se pueden originar en el complejo de proteína que se encuentra en la superficie de un linfocito T. Tras la activación del linfocito T, el complejo de proteína participa en la transducción de las señales generadas a través de un receptor de antígeno. En resumen, la activación del linfocito T inicia una cascada de eventos que incluyen un aumento de la reticulación de los receptores de antígeno. La reticulación del receptor puede contribuir a la fuerte señalización mitogénica que conduce a la inducción de ciertas citocinas tales como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ). Estas citocinas son conocidas por ser tóxicas si se generan en grandes cantidades.

Por ejemplo, actualmente se usan mAb anti-CD3 en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, incluyendo diabetes sacarina de tipo I, en la que los linfocitos T median el ataque contra los islotes pancreáticos, que producen insulina (Kaufman A, y Herold K. "Anti-CD3 mAbs for treatment of type 1 diabetes" *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25: 302-306). Los anticuerpos anti-CD3 son conocidos por inhibir la lisis de las dianas por los linfocitos T y por potenciar la reticulación del receptor de antígenos CD3. Además, junto con su actividad mitogénica potente, el anticuerpo anti-CD3 es conocido por ser un potente inductor de citocinas, específicamente, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina-2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ). La enorme liberación de citocinas, en particular TNF- α , por los linfocitos T en respuesta al fármaco (Chatenoud L.) produce efectos tóxicos. Estos efectos secundarios no deseados se han atribuido a la reticulación de los linfocitos T portadores de moléculas CD3 y células portadoras de FcR que se unen a la porción Fc de los anticuerpos. La reticulación activa tanto los linfocitos T como las células portadoras de FcR, conduciendo a la liberación masiva de citocinas como se mencionó anteriormente.

Del mismo modo, podrían producirse posibles efectos secundarios no deseados al usar anticuerpos anti-OX40. Por ejemplo, los anticuerpos anti-OX40 que se unen a linfocitos T que expresan OX40 también pueden unirse a células portadoras de FcR y desencadenar la producción de citocinas que pueden ser beneficiosas o perjudiciales para los pacientes tratados con el anticuerpo. Para superar este problema potencial, se han diseñado y presentado en el presente documento procedimientos de mutación de la porción de FcR de los anticuerpos anti-OX40 para evitar los efectos tóxicos y proporcionar las mutaciones a la porción de FcR que puedan ser deseables.

Es conocido el sitio de la IgG1 humana que interactúa con FcR (CD16, CD32 y CD64). Reside en el dominio CH2 superior. Los aminoácidos más importantes son los dos residuos de Leu en las posiciones 234 y 235. Mediante la mutación de estos dos residuos a dos residuos de Ala, se anulan las interacciones de IgG1 con todos los FcR. El anti-CD3 humanizado que incorpora estas mutaciones (HuOKT3AA) es un fármaco mucho más seguro y tiene un mecanismo de acción que es diferente que el de HuOKT3. Véase, *p.ej.*, la pat. de EE. UU. N° 6.491.916.

Las posiciones del mutante AA se muestran a continuación:

234 235

---A---P---E---L---L---G---G---P--- CH2 superior de IgG1 de tipo silvestre

---A---P---E---A---A---G---G---P--- AA CH2 superior de IgG1 mutante

- 5 Hu222AA y Hu122AA descritos en el presente documento pueden contener estas mutaciones. Si el sistema de ensayo contiene células portadoras de FcR, se pueden ver las diferencias entre el tipo silvestre y el mutante AA. De lo contrario, los dos anticuerpos deberían comportarse igual.

10 El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (también en un gen de cadena ligera de Fab) ligando operativamente el ADN que codifica VL con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera CL. Las secuencias de los genes de la región constante de cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) "Sequences of Immunological Interest", 5ª edición, U.S. Department of Health and Human Services, n.º de publicación del NIH: 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que engloban estas regiones mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda.

15 Para crear un gen de scFv, se ligan operativamente los fragmentos de ADN que codifican VH y VL con otro fragmento que codifica un ligador flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly.sub, 4-Ser).sub.3, de manera que la secuencias de VH y VL se pueden expresar como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones VL y VH unidas por el ligador flexible (véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988). Science 242: 423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5879-5883; McCafferty et al., Nature (1990) 348: 552-554.

25 Se contemplan la modificación o modificaciones de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se realiza cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar al constructo final, a condición de que el constructo final posea las características deseadas. Se pueden introducir alteraciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo en cuestión en el momento en que se elabore esa secuencia.

30 Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son localizaciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis de barrido con alanina", como se describe por Cunningham y Wells (1989) Science, 244: 1081-1085. Aquí, se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys, y glu) y se reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferiblemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan entonces, introduciendo más u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, aunque el sitio para introducir una variación en la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación en sí no tiene que estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar la actuación de una mutación en un sitio dado, se realiza mutagénesis de barrido con ala o aleatoria en el codón o región diana y se criban las inmunoglobulinas expresadas para detectar la actividad deseada.

45 Las inserciones en las secuencias de aminoácidos incluyen fusiones amino- y/o carboxiterminales en el intervalo de longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Los ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N-terminal o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión con los extremos N o C del anticuerpo de una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la vida media en suero del anticuerpo. Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Dicha alteración incluye la deleción de uno o más restos de carbohidrato que se encuentran en el anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

50 Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo reemplazado por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 de la pat. de EE. UU. N° 7.812.133, col. 43, l. 55 a Col. 44 l. 49 y bajo el título de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 1 o, como se describe más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, pueden introducirse y cribarse los productos.

Además, se logran modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en la zona de sustitución, por ejemplo en conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos de origen natural se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral: (1) hidrófobos: norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) ácidos: Asp, Glu; (4) básicos: His, Lys, Arg; (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro y (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe. Las sustituciones no conservativas conllevarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

Para expresar los anticuerpos, o porciones de anticuerpo, descritos en el presente documento, se insertan ADN que codifican cadenas ligera y pesada de longitud parcial o completa, obtenidas como se describió anteriormente, se insertan en vectores de expresión de tal modo que los genes estén ligados operativamente a secuencias de control de la transcripción y la traducción. En este contexto, la expresión "ligado operativamente" pretende significar que un gen de anticuerpo se liga en un vector de tal modo que las secuencias de control de la transcripción y la traducción dentro del vector sirvan para su función pretendida de regular la transcripción y traducción del gen de anticuerpo. Las secuencias del vector de expresión y de control de expresión se eligen para ser compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de la cadena ligera de anticuerpo y el gen de la cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vectores separados o, más típicamente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos se insertan en el vector de expresión mediante procedimientos estándares (por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento del gen del anticuerpo y el vector, o ligamiento de extremos romos si no hay sitios de restricción presentes).

Como se muestra en la FIG. 23, una de dichas estructuras esquemáticas del vector de expresión para el anticuerpo Hu 106-222 IgG1/kappa. Procediendo en sentido horario desde el sitio Sall en la parte superior, el plásmido contiene la unidad de transcripción de la cadena pesada que comienza por el promotor / potenciador temprano inmediato principal del citomegalovirus humano (CMV) (promotor del CMV) para iniciar la transcripción del gen de la cadena pesada del anticuerpo. A continuación del promotor del CMV está el exón VH, una secuencia genómica que contiene la región constante de cadena pesada gamma-1 humana, incluyendo los exones CH1, de bisagra, CH2 y CH3 con los intrones intermedios, y el sitio de poliadenilación después del exón CH3. Después de la secuencia del gen de la cadena pesada, la unidad de transcripción de la cadena ligera comienza con el promotor del CMV, seguido por el exón VL y una secuencia genómica que contiene el exón de la región constante de la cadena kappa humana (CL) con una parte del intrón anterior, y el sitio de poliadenilación después del exón CL. Después del gen de la cadena ligera está el promotor temprano del SV40 (promotor del SV40), el gen de la xantina guanina fosforibosiltransferasa (gpt) de *E. coli* y un segmento que contiene el sitio de poliadenilación del SV40 (sitio de poli(A) del SV40). Por último, el plásmido contiene una parte del plásmido pUC19, que comprende el origen de replicación bacteriano (pUC ori) y el gen de la beta-lactamasa (beta-lactamasa). En la figura se muestra la localización de los sitios de escisión de las enzimas de restricción relevantes.

El vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilite la secreción de la cadena de anticuerpo en una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede clonarse en el vector de tal modo que el péptido señal esté ligado en fase con el extremo amino del gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido señal de una proteína no inmunoglobulina).

Como se señaló anteriormente, además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes divulgados en el presente documento portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una célula huésped. La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlen la transcripción o traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; "Gene Expression Technology: Methods in Enzymology" 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Se apreciará que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped a transformar, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Las secuencias reguladoras preferidas para la expresión en células huésped de mamífero incluyen elementos víricos que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células de mamíferos, tales como promotores y/o potenciadores derivados de citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/potenciador de CMV), de virus de simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), de adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)) y poliovirus. Para una descripción adicional de elementos reguladores víricos, y secuencias de los mismos, véase, por ejemplo, la pat. de EE. UU. N° 5.168.062 de Stinski, la pat. de EE. UU. N° 4.510.245 de Bell et al. y la pat. de EE. UU. N° 4.968.615 de Schaffner et al., la pat. de EE. UU. N° 5.464.758 de Bujard et al. y la pat. de EE. UU. N° 5.654.168 de Bujard et al.

Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las pat. de EE. UU. n.º 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et al.). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped

en la que se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr.sup.- con selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección con G418).

5 Para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas, se transfecta el vector o vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras en una célula huésped mediante técnicas estándares. Las diversas formas del término "transfección" pretenden englobar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción de ADN exógeno en una célula huésped procarionta o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano y similares. Aunque es teóricamente posible expresar los anticuerpos en células huésped procariontas o eucariotas, la expresión de anticuerpos en células eucariotas, y lo más preferentemente células huésped de mamífero, es la más preferida debido a que dichas células eucariotas, y en particular células de mamíferos, son más propensas que las células procariontas a ensamblarse y secretar un anticuerpo correctamente plegado e inmunológicamente activo. Las células huésped de mamífero para expresar los anticuerpos recombinantes descritos en el presente documento incluyen las células de ovario de hámster chino (células CHO) (tales como células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 10 4216-4220, usadas con un marcador seleccionable DHFR, por ejemplo, como se describe en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159: 601-621), células de mieloma NS0, células COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo en células huésped de mamífero, se producen los anticuerpos cultivando las células huésped durante un período de tiempo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se hacen crecer las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo usando procedimientos de purificación de proteínas estándares.

Las células huésped también se pueden usar para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como fragmentos Fab o moléculas de scFv. Se entenderá que las variaciones sobre el procedimiento anterior están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que 25 codifica la cadena ligera o la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de esta invención. La tecnología de ADN recombinante también puede usarse para eliminar algunas o todas las moléculas de ADN que codifican una o ambas cadenas ligera y pesada que no son necesarios para la unión a OX40. Las moléculas expresadas a partir de dichas moléculas de ADN truncadas también se engloban en los anticuerpos de la invención. Además, pueden producirse anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son un anticuerpo de la invención y la otra cadena pesada y ligera son específicas de un antígeno distinto de OX40 mediante reticulación de un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo mediante procedimientos de reticulación química estándares.

Composiciones farmacéuticas y administración farmacéutica

Los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la invención pueden incorporarse a composiciones farmacéuticas adecuadas para administración a un sujeto. Típicamente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo o 35 porción de anticuerpo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y 40 similares, así como combinaciones de los mismos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender además cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la vida útil o eficacia del anticuerpo o porción de anticuerpo.

45 Los anticuerpos y porciones de anticuerpo descritos en el presente documento pueden incorporarse a una composición farmacéutica adecuada para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). Las composiciones pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de administración líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables o para infusión), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo pretendido de administración y la aplicación terapéutica. Las composiciones típicas están en forma de soluciones inyectables o para infusión, tales como composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de seres humanos con otros anticuerpos. El anticuerpo puede administrarse por infusión o inyección intravenosa o inyección intramuscular o subcutánea.

55 La vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un vehículo que evitará una liberación rápida del compuesto, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos procedimientos para la preparación de dichas 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.

60

Pueden incorporarse también ingredientes activos suplementarios a las composiciones. En ciertas realizaciones, se coformula y/o coadministra un anticuerpo o porción de anticuerpo descrito en la presente memoria con uno o más agentes terapéuticos adicionales que son útiles para el tratamiento de trastornos en los que la inactivación de OX40 es perjudicial. Por ejemplo, un anticuerpo o porción de anticuerpo anti-OX40 de la invención puede coformularse y/o

5 coadministrarse con uno o más anticuerpos adicionales que se unen a otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citocinas o que se unen a moléculas de la superficie celular). Además, uno o más anticuerpos divulgados en el presente documento pueden usarse en combinación con dos o más de los agentes terapéuticos anteriores. Dichas terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones más bajas de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas a las diversas

10 monoterapias. Se apreciará por el experto en la técnica que cuando se usan los anticuerpos de la invención como parte de una terapia de combinación, puede ser deseable una dosis más baja de anticuerpo que cuando el anticuerpo se administra en monoterapia a un sujeto (por ejemplo, puede lograrse un efecto terapéutico sinérgico mediante el uso de la terapia de combinación lo que, a su vez, permite el uso de una dosis más baja del anticuerpo para conseguir el efecto terapéutico deseado).

15 Los anticuerpos descritos en el presente documento, o porciones de unión a antígeno de los mismos se pueden usar solos o en combinación para tratar dichas enfermedades. Se debe entender que estos anticuerpos o porción de unión a antígeno de los mismos se pueden usar solos o en combinación con un agente adicional, por ejemplo, un agente terapéutico, seleccionándose dicho agente adicional por el experto en la técnica para su uso previsto. Por ejemplo, el agente adicional puede ser un agente terapéutico reconocido en la técnica que sea útil para el

20 tratamiento de la enfermedad o afección que se trata mediante el anticuerpo revelado en el presente documento. El agente adicional también puede ser un agente que confiera un atributo beneficioso a la composición terapéutica por ejemplo, un agente que afecte a la viscosidad de la composición.

Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden incluir una "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad profilácticamente eficaz" de un anticuerpo o porción de anticuerpo de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y

25 durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. La cantidad eficaz del anticuerpo o porción de anticuerpo puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad del anticuerpo o porción de anticuerpo de desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Es una cantidad terapéuticamente eficaz también aquella en que los efectos tóxicos o perjudiciales del anticuerpo o porción de anticuerpo se compensan por los efectos terapéuticamente

30 beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" hace referencia a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado.

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

35 dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o incrementar la dosis de forma proporcional según requieran las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación por su facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento hace referencia a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad

40 predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones de las formas unitarias de dosificación están dictadas y son directamente dependientes de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico o profiláctico particular a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formulación farmacéutica de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

45 **Ejemplo I**

Se purificaron anticuerpos monoclonales 106-222 IgG1/kappa quiméricos y humanizados (Ch222 y Hu222, respectivamente) a partir de sobrenadantes de cultivo de los correspondientes transfectantes estables de NS0 usando una columna de proteína A como se describe en los Apéndices A y B. Hu222 se eluyó de la columna de dos

50 maneras diferentes. En pocas palabras, el lote I de Hu222 se eluyó con tampón de pH bajo y el lote II con tampón de elución Gentle Ag/Ab de Pierce. El rendimiento de Hu222 era mejor cuando se usaba el tampón de pH bajo para la elución. Ch222 se eluyó de la columna con tampón de elución Gentle Ag/Ab.

Los anticuerpos Hu222 del lote I y II purificados se caracterizaron por PAGE-SDS junto con 106-222 de ratón de acuerdo con procedimientos estándares. Cinco µg de cada anticuerpo se analizó en condiciones reductoras. Como se muestra en la FIG. 21, cada uno de los anticuerpos Hu222 del lote I y II está compuesto por una cadena pesada

55 con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa y una cadena ligera con un peso molecular de aproximadamente 25 kDa. La pureza de los anticuerpos Hu222 del lote I y II parecía ser de más del 95 %.

Se analizó la contaminación por endotoxinas en los anticuerpos humanizados con el kit de lisado de amebocitos de Limulus de Lanza (LAL) QCL-1000. El nivel de endotoxina era menor de 0,5 UE/mg de proteína tanto para los anticuerpos Hu222 del lote I como II.

Caracterización de Hu106-222 por unión a células L/OX40

Se examinó la unión de anticuerpos 106-222, Ch106-222 y Hu 106-222 de ratón de OX40 en un ensayo de unión FACS con células L/hOX40 esencialmente de acuerdo con el protocolo suministrado por la Dra. Laura Bover. Se detectaron los anticuerpos unidos a las células L/hOX40 L con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con PE (para 106-222 de ratón) o anticuerpo de cabra anti-IgG humana marcado con PE (para Ch106 y Hu 106).

La FIG. 22 muestra el análisis en los anticuerpos 106-222, Ch106 y Hu106-222 de ratón (Lote II) de la unión a células L/OX40. La curva de valoración de Hu106-222 (Lote II) era casi idéntica a la de Ch106-222, lo que indica que la afinidad de unión al antígeno de 106-222 de ratón se mantiene en Hu106-222. La curva de valoración de 106-222 de ratón era similar a las de Ch106 y Hu106; sin embargo, debido a la diferencia de los anticuerpos secundarios, los datos sólo indican que la afinidad de 106-222 de ratón es similar a la de Hu106-222.

La FIG. 24 muestra la comparación entre los anticuerpos Hu106-222 del lote I y II por la unión a células L/hOX40. Aunque se necesita un análisis más detallado, la afinidad de los dos lotes de Hu106-222 parecía ser similar, si no idéntica, entre sí. Por tanto, la elución ácida de Hu106-222 de una columna de proteína A no parece afectar a su afinidad.

15 Purificación de Ch106-222

Se hizo crecer el transfectante estable C8 de NS0 en 500 ml de medio SFM de hibridoma de Invitrogen en una botellas de rotación hasta el agotamiento. Se centrifugó el cultivo en un tubo de centrifuga de 250 ml de Coming (n° de Cat. 430776) en una centrifuga Allegra X-12R de Beckman Coulter (2000 rpm durante 15 minutos). Se cargó el sobrenadante del cultivo se cargó en una columna de 1 ml HiTrap MabSelect SuRe de GE Healthcare (n° de cat. 11-034-95) usando una bomba PI de Pharmacia. Se lavó la columna con solución salina tamponada con Tris (Pierce, n° de cat. 28379) y se eluyó con tampón de elución Gentle Ag/Ab de Pierce (n° de cat. 21027). Se recogieron las fracciones (aproximadamente 1 ml) y se leyeron sus DO a 280 nm.

N° de fracción	DO a 280 nm
3	0,12
4	0,30
5	0,18
6	0,11

Las fracciones 3 a 6 se combinaron (volumen = 3,0 ml, DO a 280 nm = 0,14). Las fracciones combinadas se desalaron en una columna media Sephadex G25 de 10 ml en PBS. Se recogieron fracciones de 1 ml.

N° de fracción	DO a 280 nm
5	0,09
6	0,19
7	0,12
8	0,12
9	0,00

Las fracciones 6 a 9 se combinaron (volumen = 3,0 ml, DO a 280 nm = 0,11). Las fracciones combinadas se dializaron durante la noche en PBS. Después de la diálisis, el volumen era de 3,0 ml y la DO a 280 nm era 0,19. Esta preparación se denomina Ch106, lote 8/31/09, con una concentración de 0,13 mg/ml.

Purificación de Hu106-222

Se hizo crecer el transfectante estable 1-C6 de NS0 en 500 ml de medio SFM de hibridoma de Invitrogen en una botella de rotación hasta el agotamiento. Se centrifugó el cultivo en un tubo de centrifuga de 250 ml de Coming (n.° de cat. 430776) en una centrifuga Allegra X-12R de Beckman Coulter (2000 rpm durante 15 minutos).

Lote 1: Se cargaron 150 ml del sobrenadante del cultivo sobre una columna HiTrap MabSelect SuRe de GE Healthcare de 1 ml (n° de cat. 11-034-95) utilizando una bomba PI de Pharmacia. La columna se lavó con PBS y el anticuerpo unido se eluyó con glicina-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M (pH 3,0). Se recogieron las fracciones eluidas (1 ml cada una) en tubos que contenían 50 µl de Tris-HCl 1 M (pH 8,0).

Nº de fracción	DO a 280 nm
2	0,88
3	2,84
4	1,29
5	0,63
6	0,18

Las fracciones 2 a 5 se combinaron (volumen = 4,2 ml, DO a 280 nm = 1,59). Las fracciones combinadas se dializaron durante la noche en PBS. Después de la diálisis, el volumen era de 4,2 ml y la DO a 280 nm era 1,54. La solución de anticuerpo (lote 18/09/09 I; 1,1 mg/ml) se esterilizó por filtrado.

Lote II:

- 5 Se cargó el sobrenadante del cultivo restante (350 ml) sobre una columna HiTrap MabSelect SuRe de GE Healthcare de 1 ml usando una bomba PI de Pharmacia. La columna se lavó con solución salina tamponada con Tris y se eluyó con tampón de elución Gentle Ag/Ab. Se recogieron las fracciones (aproximadamente 1 ml) y se leyeron sus DO a 280 nm.

Nº de fracción	DO a 280 nm
2	0,12
3	0,85
4	2,17
5	1,47
6	1,02
7	0,81
8	0,66
9	0,54
10	0,44
11	0,46

- 10 Las fracciones 3 a 7 se combinaron (volumen = 4,2 ml, DO a 280 nm = 1,22). La columna se lavó de nuevo con solución salina tamponada con Tris y el anticuerpo se eluyó con glicina-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M (pH 3,0) para examinar si la elución con tampón de elución Gentle Ag/Ab era eficaz.

Nº de fracción	DO a 280 nm
1	0,05
2	0,05
3	1,23
4	0,49
5	0,10

Las fracciones 3 a 7 eluidas con tampón de elución Gentle Ag/Ab se combinaron y se desalaron en una columna Sephadex G25 media de 10 ml en PBS. Se recogieron fracciones de 1 ml.

Nº de fracción	DO a 280 nm
4	0,38
5	0,96

Nº de fracción	DO a 280 nm
6	1,38
7	1,33
8	1,10
9	0,12

Las fracciones 5 a 8 se combinaron (volumen = 4,0 ml, DO a 280 nm = 1,12). Las fracciones combinadas se dializaron durante la noche en PBS. Después de la diálisis, el volumen era de 4,0 ml y la DO a 280 nm era 1,12. La solución de anticuerpo (lote 18/09/09 II; 0,8 mg/ml) se esterilizó por filtración.

- 5 El procedimiento de elución rico en sal con tampón de elución Gentle Ag/Ab de Pierce no era tan eficaz como el procedimiento de bajo pH para eluir el anticuerpo de IgG1 humana unido de la columna de proteína A. Como los anticuerpos no se eluyeron en un pico estrecho con el tampón de elución Gentle Ag/Ab, fue necesario combinar muchas fracciones para recoger la IgG eluida y desalar las fracciones combinadas antes de la diálisis. El mal perfil de elución con tampón de elución Gentle Ag/Ab y la etapa de purificación adicional afectaron al rendimiento del anticuerpo. Se aconseja usar el procedimiento de elución rico en sal sólo si la IgG a purificar es lábil a ácido.

10 Ejemplo II

Purificación de anticuerpos Ch119-122 y Hu119-122

- 15 Se purificó el anticuerpo monoclonal quimérico 119-122 IgG1/kappa (Ch119) a partir de sobrenadante de cultivo del correspondiente transfectante estable de NS0 (clon G11) cultivado en medio SFM de hibridoma (Invitrogen) usando una columna de proteína A. Después de eluir con tampón de elución Gentle Ag/Ab de Pierce, se cambió el tampón de Ch119 a PBS por filtración en gel y después diálisis. La concentración de Ch119 era 0,21 mg/ml.

Se purificó anticuerpo monoclonal humanizado 119-122 IgG1/kappa (Hu122) del sobrenadante de cultivo del correspondiente transfectante estable de NS0 (clon 2F5) cultivado en medio SFM de hibridoma usando una columna de proteína A. Se eluyó Hu106-222 de la columna con tampón de pH bajo, se neutralizó con Tris-HCl 1 M (pH 8,0) y se dializó en PBS. La concentración de Hu122 era 1,6 mg/ml.

- 20 Se caracterizó el Hu106-222 purificado por PAGE-SDS junto con 119-122 de ratón de acuerdo con procedimientos estándar. Se analizaron cinco µg de cada anticuerpo en condiciones reductoras. Como se muestra en la FIG. 25, el Hu119-122 está compuesto por una cadena pesada con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa y una cadena ligera con un peso molecular de aproximadamente 25 kDa. La pureza de Hu119 parecía ser más del 95 %.

Caracterización de Hu119-122 por la unión a células L/hOX40

- 25 Se examinó la unión de anticuerpos 119-122, Ch119-122 y Hu119-122 de ratón a OX40 en un ensayo de unión FACS con células L/OX40 esencialmente de acuerdo con el protocolo suministrado por la Dra. Laura Bover. Se detectaron los anticuerpos unidos a las células L/OX40 con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con PE (para 119-122 de ratón) o anticuerpo de cabra anti-IgG humana marcado con PE (para Ch119-122 y Hu119-122).

- 30 La FIG. 26 muestra el resultado del análisis FACS. La curva de valoración de Hu119-122 era similar a la de Ch119-122, lo que sugiere que la afinidad de unión a antígeno de 119-122 de ratón se mantiene en Hu119-122. Sin embargo, los valores de MCF a concentraciones de anticuerpos más altas de Ch109-122 y Hu119-122 coinciden con las curvas correspondientes. Después de ajustar las condiciones experimentales, el análisis por FACS se debe repetir.

Ejemplo III

- 35 Para evaluar la capacidad de los anticuerpos anti-OX40 humano humanizados de potenciar la proliferación de linfocitos T, se realizaron ensayos de proliferación usando células CD32-L recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y linfocitos T CD4⁺ indiferenciados recién clasificados. La FIG. 27 muestra que el clon 119-122 de mAb anti-OX40 humano (Hu122), y su anticuerpo mutado de unión a FcR (Hu122-AA) potenciaban la proliferación de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados. Hu122 procuraba mejor actividad estimulante de linfocitos T que el mAb de ratón anti-OX40 humano parental (122 de ratón). (FIG. 27).

- 40 El clon 106-222 de mAb mutado humanizado anti-OX40 de unión a FcR (Hu222-AA) y el clon 106-222 de mAb quimérico anti-OX40 humano (Ch222) potenciaban la proliferación de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados estimulados por anti-CD3. Estos anticuerpos tienen actividad estimulante similar a la del mAb de ratón anti-OX40 humano parental (106-222 de ratón). Sin embargo, el Ab totalmente humanizado anti-OX40 humano, Hu106, no potenciaba la proliferación de linfocitos T. (FIG. 28)

45 Para evaluar la capacidad de los anticuerpos humanizados anti-OX40 humano de bloquear la función supresora de

linfocitos T reguladores (Treg) CD4⁺, se realizaron ensayos de proliferación usando linfocitos T CD4⁺ indiferenciados recién clasificados y Treg CD4⁺ CD25^{alto} D127^{bajo}. Se encontró que el anticuerpo quimérico Ch122 y el anticuerpo humanizado mutado de unión a Fc (Hu122-AA) exhibían mejor potencia que el mAb de ratón anti-OX40 humano parental (122 de ratón) en el bloqueo de la función supresora de Treg CD4⁺. (FIG. 29 A-B)

5 En el experimento de la FIG. 27, se estimularon linfocitos T CD4⁺CD25^{bajo}CD127⁺CD45ROCD45RA⁺ indiferenciados con células L que expresan CD32 (CD32-L) recubiertas con 4 concentraciones de anticuerpos anti-CD3 más 2 µg/ml de anticuerpos de clon 119 de Ab anti-OX40 humano o anticuerpos de control. Tres días después de la estimulación, se añadió el radioisótopo tritio y se cultivaron durante 16-18 horas adicionales antes de la cosecha de células. Los datos son representativos de los experimentos de dos donantes. Las células CD32-L que expresan ligando hOX40 (CD32-L/hOX40L) sirven como control positivo, mientras que IgG1 humanas y de ratón sirven como controles negativos.

15 En el experimento de la FIG. 28, se estimularon linfocitos T CD4⁺ indiferenciados recién clasificados con células CD32-L recubiertas con 4 concentraciones de anticuerpos anti-CD3 más 2 µg/ml de anticuerpos de clon 106-222 de mAb anti-OX40 humano (Hu222) o anticuerpos de control. Tres días después de la estimulación, se añadió el radioisótopo tritio y se cultivaron durante 16-18 horas adicionales antes de la cosecha de células. Los datos son representativos de experimentos de dos donantes. CD32-L/hOX40L sirve como control positivo, mientras que IgG1 humana y de ratón sirven como controles negativos.

20 En el experimento de la FIG. 29, se cultivaron linfocitos T CD4⁺ indiferenciados recién clasificados en presencia de Treg CD4⁺ CD25^{alto} CD127^{bajo} a tres relaciones de Treg/ efectoras T y se estimularon con células CD32-L recubiertas con 0,2 µg/ml de anticuerpos anti-CD3 más 10 µg/ml de anticuerpos del clon 119-122 de mAb anti-OX40 humano o anticuerpos de control. Tres días después de la estimulación, se añadió el radioisótopo tritio y se cultivaron durante 16-18 horas adicionales antes de la cosecha de células. Los datos son representativos de tres experimentos. CD32-L/hOX40L sirve como control positivo, mientras que IgG1 humana y de ratón sirven como controles negativos.

Ejemplo IV

25 Dado que los anticuerpos se encontrarán con las células mononucleares de sangre periférica total (PBMC) cuando se les administra a los pacientes mediante inyección intravenosa, se probó la capacidad de los anticuerpos anti-OX40 humano de estimular la proliferación de linfocitos T usando PBMC como las células presentadoras de antígeno (APC) en los ensayos de proliferación. Sin embargo, se obtuvieron datos muy variables con los mAb de ratón anti-OX40 humano usando las PBMC como APC que no se observan cuando se usan monocitos como APC, lo que sugiere que los anticuerpos requieren algún tipo de reticulación para la actividad. Para probar esta posibilidad, las placas se recubrieron con los mAb anti-OX40 humano y anti-CD3, se lavaron, y se usaron para estimular la proliferación de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en ausencia de células accesorias. La FIG. 30 muestra los resultados de que los anticuerpos anti-OX40 humano potencian la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

35 Se estimularon 1×10^5 linfocitos T CD4⁺ CD25^{bajo} CD45RO⁻ CD45RA⁺ T indiferenciados (FIG. 30A) o linfocitos T CD3⁺ CD8⁺ (FIG. 30B) con mAb anti-CD3 (3 µg/ml) y de ratón anti-OX40 humano (2 µg/ml) unidos a la placa. Se añadió timidina tritiada en el tercer día de cultivo y las células se recolectaron después de otras 15 horas de incubación. La proliferación de linfocitos T se evaluó mediante la incorporación de timidina. Se obtuvieron mAb anti-OX40 humano a partir de tres fusiones de hibridoma. Los números después del número de fusión denotan un anticuerpo específico. IgG1 de ratón y 119-42 sirvieron como controles negativos. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Se muestran los datos representativos de 4 donantes de linfocitos T. (FIG. 30C). Las tres versiones de mAb humanizados anti-OX40 humano [Hu106-222 y Hu119-122; Hu106-222AA y Hu119-122AA (AA denota que dos de los residuos de unión a Fc se mutaron al aminoácido alanina); y Ch119-122 (similar a 119-122 humanizado, excepto porque se mantuvo la región variable "paratopo" de ratón)] estimulaban la proliferación de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados. Anti-CD28 sirvió como control positivo.

45 Como se muestra en la FIG. 30, los paneles A y B muestran que los mAb anti-OX40 humano unidos a la placa estimulaban potentemente la proliferación de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados y de linfocitos T CD8⁺ en un intervalo de 10 a 40 veces. Se ampliaron los estudios para los mAb anti-OX40 humano humanizados y se encontró que las tres versiones de los anticuerpos humanizados, tanto totalmente humanizado, como quimérico y los mutantes AA en los que los residuos responsables de la unión al receptor de Fc se alteraban a alanina, eran potentes estimulantes de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ indiferenciados (FIG. 30C).

55 La FIG. 31 muestra anticuerpos anti-OX40 humano de ratón y humanizados que requieren reticulación con el fin de potenciar la proliferación de linfocitos T. Se estimularon linfocitos T CD4⁺ indiferenciados recién clasificados con mAb anti-CD3 unido a la placa (3 µg/ml) más anti-OX40 humano unido a la placa o soluble humanizado (2 µg/ml) en ausencia de células accesorias. Se añadió timidina tritiada en el tercer día de cultivo y las células se recolectaron después de otras 15 horas de incubación. La proliferación de linfocitos T se evaluó mediante la incorporación de timidina. IgG1 de ratón y anti-CD28 sirvieron como controles negativos y positivos, respectivamente. Se muestran datos representativos de dos donantes. Se estimularon linfocitos T CD4⁺ indiferenciados con anti-CD3 unido a la placa en ausencia de células accesorias. El día siguiente, se añadió mAb 119-122 anti-OX40 humano (2 µg/ml) solo o en combinación con la misma cantidad de un anticuerpo secundario contra Fc. Se evaluó la proliferación celular

como se describe en el panel A.

La potencia de los mAb anti-OX40 humano humanizados Hu106-222 y Hu119-122 era comparable a la de anti-CD28. En contraste, cuando se añadió anticuerpo anti-OX40 humano soluble al cultivo de linfocitos T, se anuló el efecto estimulante (FIG. 31A). Sin embargo, cuando se añadió mAb 119-122 anti-OX40 humano soluble junto con un fragmento F(ab')₂ de cabra anti-IgG de ratón, anticuerpo secundario específico del fragmento Fc, se restauró el efecto estimulante (FIG. 31B). Estos resultados demuestran que los mAb anti-OX40 humano requieren reticulación para sus actividades biológicas.

Para evaluar la capacidad de los mAb anti-OX40 humano agonistas de bloquear la función supresora de nTreg CD4⁺ CD25^{alto} CD127⁻, se realizaron ensayos de proliferación en presencia de linfocitos T efectores CD4⁺ CD25^{bajo} CD127⁺ + CD45RO⁺ (Tef) y nTreg CD4⁺. Mediante el uso del sistema unido a la placa en que se recubrían mAb anti-OX40 humano junto con anti-CD3 sobre una placa y en ausencia de células accesorias, doce (222, 132, 8B, 33 A, 43, 58B, 122, 157A, 173B, 220C, 140A, 270) de los mAb de ratón anti-OX40 humano inhibían potentemente la supresión de nTreg (FIG. 32A y 32B). Aunque la relación entre nTreg y linfocitos T efectores usada en estos ensayos era de 1:1, estos anticuerpos fueron capaces de estimular los linfocitos T efectores a proliferar de 10 a 35 por ciento por encima del porcentaje alcanzado por los linfocitos T efectores en ausencia de nTreg. Los mAb anti-OX40 humano humanizados revertían también la función supresora de nTreg a niveles similares (FIG. 32C). Estos resultados tomados en conjunto sugieren que los mAb de ratón anti-OX40 humano son potentes estimulantes de OX40, lo que da como resultado un potenciamiento significativo de la proliferación de linfocitos T y la inhibición de la función supresora de nTreg. Además, los mAb anti-OX40 humano humanizados mantenían las actividades biológicas potentes de sus anticuerpos de ratón parentales.

La FIG. 32 muestra que los mAb anti-OX40 humano bloquean la actividad de nTreg CD4⁺ FOXP3⁺. Los linfocitos T efectores CD4⁺ CD25⁻ CD45RO⁺ marcados con CFSE y Treg CD4⁺ FOXP3⁺ derivaban del mismo donante sano. Se estimularon los linfocitos T con Ab anti-CD28 soluble (0,5 µg/ml) y anti-CD3 (3 g/µl) unido a la placa y mAb anti-OX40 humano (2 µg/ml). La proliferación de linfocitos T efectores se evaluó por citometría de flujo por dilución de CFSE. La relación entre nTreg y linfocitos T efectores era 1:1. IgG1 de ratón sirvió como control negativo. Los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados sirvieron como linfocitos T de control para demostrar la inhibición específica de la proliferación de linfocitos T efectores por nTreg. La FIG. 32A son datos de FACS representativos que muestran la proliferación de linfocitos T efectores en presencia de linfocitos T CD4⁺, nTreg o nTreg más mAb 119-33A anti-OX40 humano. La FIG. 32B muestra el porcentaje de proliferación de linfocitos T efectores en presencia de nTreg después del tratamiento con un mAb de ratón anti-OX40-humano (20 probados). La FIG. 32C muestra que las tres versiones de mAb anti-OX40 humano humanizados restauraban la proliferación de linfocitos T efectores.

Un informe reciente sugiere que la activación de OX40 puede inducir la apoptosis de una línea de linfocitos T humanos que expresan OX40 (Yoshiaki Takahashi et al., 200B, AIDS Research and human retroniruses, 24). Por lo tanto, se probó el efecto de concentraciones crecientes del mAb 106-222 anti-OX40 humano más una dosis fija baja de anti-CD3 sobre la supervivencia de tres subconjuntos de linfocitos T en presencia de monocitos. La FIG. 33 A muestra que las altas concentraciones del mAb 106-222 anti-OX40 humano (20-30 µg/ml) preferentemente destruían nTreg FOXP3⁺ activados, mientras que los linfocitos T CD4⁺ indiferenciados y de memoria activados eran resistentes o menos susceptibles a este efecto. Para probar si el mAb anti-OX40 humano actúa directamente sobre los Treg para inducir la muerte celular, se realizaron nuevos experimentos en ausencia de células accesorias. La FIG. 33B muestra que la señalización fuerte de OX40 en combinación con anti-CD3 destruía específicamente nTreg en ausencia de células accesorias. Para confirmar si los efectos destructores mediados por mAb anti-OX40 humano imitaban la activación de OX40 por el ligando OX40 natural, se usó una línea celular de fibroblasto L de ratón que sobreexpresaba hOX40L y se usó para estimular nTreg en presencia de una dosis baja de anti-CD3, y se obtuvieron efectos similares sobre la destrucción de nTreg (FIG. 33C). Estos resultados sugieren que la activación fuerte de OX40 destruye Treg que expresan OX40.

Específicamente, la FIG. 33 muestra que una alta concentración de mAb anti-OX40 humano destruye preferentemente Treg FOXP3⁺. En la FIG. 33A, se cultivaron subconjuntos de linfocitos T (indiferenciados, CD4⁺ CD25^{bajo} CD127⁺ CD45RO⁻ CD45RA⁺, de memoria, CD4⁺ CD25^{bajo} CD127⁺ CD45RA⁻ CD45RO⁺ y nTregs CD4⁺ CD25^{alto} CD127^{bajo}) cada uno con una relación igual de monocitos CD14⁺ en presencia de anti-CD3 soluble (0,3 µg/ml) y concentraciones crecientes del mAb 106-22 anti-OX40 humano. La viabilidad celular se determinó después de 3 días de cultivo mediante análisis por citometría de flujo, seleccionando linfocitos viables. Se muestran los datos de dos donantes de linfocitos T. Las FIG. 33B y 33C muestran que una fuerte activación de OX40 destruye los Treg CD4⁺FOXP3⁺. La FIG. 33B muestra que se estimularon Treg CD4⁺FOXP3⁺ con anti-CD3 unido a la placa (2 µg/ml) más mAb 119-122 soluble (30 µg por millón de células) o anticuerpo de control de IgG1 de ratón. Se contaron las células vivas negativas a azul de tripano después de un día de cultivo con un hemocitómetro. La FIG. 33C muestra que se estimularon Treg CD4⁺ FOXP3⁺ con anti-CD3 soluble (0,2 µg/ml) más células L o células L que expresan el ligando hOX40 (L/hOX40L). Las células vivas se contaron después de un día de estimulación.

A continuación, se trató de determinar si el mAb anti-OX40 humano actúa directamente sobre los linfocitos T para bloquear la función supresora de nTreg. Se preactivaron linfocitos T efectores CD4⁺ o nTreg durante la noche con anti-CD3 y se sometieron entonces a pulsos de mAb anti-OX40 humano durante 4 horas. Se lavaron entonces los linfocitos T efectores, se marcaron con CFSE y se cocultivaron con nTregs en presencia de un número igual de

monocitos CD14⁺ y anti-CD3. Del mismo modo, se lavaron los nTreg preestimulados y se cultivaron con células efectoras T marcadas con CFSE no tratadas.

La FIG. 34 muestra que los mAb anti-OX40 humano actúan directamente sobre los linfocitos T para bloquear la función supresora de Treg. La FIG. 34A muestra que el mAb anti-OX40 humano actúa directamente sobre los linfocitos T de memoria efectoras para conferir resistencia a la supresión por nTreg. Se estimularon linfocitos T CD4⁺ CD25^{bajo} CD127⁺ CD45RA⁻CD45RO⁺ de memoria con anti-CD3 unido a la placa (0,8 µg/ml) en medio de cultivo (RPMI/10 % de FCS/P/S más IL-2 a 30 UI/ml) durante 12 horas, se sometieron entonces a pulsos con mAb anti-OX40 humano (119 a 122, 22 µg por 0,5 millones de células) en medio de cultivo durante 4 horas, se lavó 3 veces y se cultivaron 8 x 10⁴ linfocitos T efectoras marcadas con CFSE con relaciones decrecientes de nTreg. La proliferación de linfocitos T efectoras se evaluó mediante citometría de flujo por dilución de CFSE. El mAb anti-OX40 humano actúa sobre los Treg haciéndolos incapaces de suprimir la proliferación de linfocitos T efectoras (FIG. 34B). Se preestimularon nTreg CD4⁺ CD25^{alto} CD127^{bajo} con anti-CD3 unido a la placa (2 µg/ml) en medio de cultivo durante 12 horas, se sometieron entonces a pulsos con mAb anti-OX40 humano, 119-122 o 106-222 o un anticuerpo de control, anti-ICOS o IgG1 de ratón, como se describe en el panel A, se lavaron y se cultivaron con linfocitos T de memoria efectoras marcadas con CFSE. La proliferación de linfocitos T efectoras se evaluó mediante citometría de flujo por dilución de CFSE.

Los linfocitos T efectoras tratados con mAb anti-OX40 humano se volvieron resistentes a la supresión por linfocitos nTreg. (FIG. 34 A). Por el contrario, la proliferación de las células efectoras tratadas con anticuerpo de control de IgG1 de ratón se mantuvo susceptible a la supresión por nTreg. La FIG. 34B muestra que los nTreg tratados con mAb anti-OX40 humano no eran capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T efectoras. Por el contrario, los nTreg tratados con anticuerpos de control, tales como anti-ICOS o IgG1 de ratón, mantuvieron la supresión. Estos resultados sugieren que los mAb anti-OX40 humano actúan directamente tanto sobre linfocitos T efectoras como sobre nTreg para restaurar la proliferación de linfocitos T efectoras.

Ejemplo V

Los datos preliminares suplementarios *in vivo* mostraron que el anticuerpo anti-OX40 humano que funciona en ratones potencia la proliferación de los linfocitos T y el rechazo tumoral en ratones. Se mostró previamente que los mAb anti-OX40 humano pueden activar específicamente la cascada de NF-kB en linfocitos T CD8⁺ de ratón transducidos con OX40 humano. Para determinar si los mAb anti-hOX40 pueden potenciar el rechazo tumoral al potenciar la supervivencia de linfocitos T efectoras CD8⁺ y la proliferación clonal *in vivo*, se transfirieron adaptativamente linfocitos T transgénicos Pmel CD8⁺ transducidos con el gen de la luciferasa y hOX40 en ratones albinos C57BL/6 portadores de tumores MC38 no pigmentados. Después de la transferencia adoptiva de los linfocitos T transducidos, se trataron los ratones con Ab. Se encontró que migraban significativamente más linfocitos T Pmel OX40⁺luciferasa⁺ humanos al pulmón en el día 4 en ratones tratados con mAb anti-hOX40 que en los ratones tratados con anticuerpo de control IgG1 (FIG. 35B), lo que indica que la activación de hOX40 en ratones promovía la proliferación de linfocitos T CD8⁺. El día 8 (datos no mostrados) y el día 12 después del tratamiento, se encontró que el mismo grupo de ratones tratados con mAb anti-hOX40 retenía significativamente más linfocitos T Pmel luciferasa⁺ en el sitio del tumor que el grupo de control de ratones tratados con IgG1 (FIG. 35B), indicando de nuevo que la activación de hOX40 en ratones promovía la supervivencia de linfocitos T CD8⁺. Finalmente, los tamaños de los tumores de los ratones que recibieron linfocitos T hOX40⁺Pmel CD8⁺ y posteriormente tratados con mAb anti-hOX40 eran significativamente menores que los de los ratones que recibieron linfocitos T Pmel no transducidos y tratados con mAb anti-hOX40 o linfocitos T Pmel hOX40⁺ seguido de tratamiento con anticuerpo IgG1 de control de ratón similar. Estos resultados muestran que la activación de OX40 humano en ratones da como resultado efectos biológicos similares a los de OX40 de ratón (Gough et MJ, 2008). Por lo tanto, los datos demuestran la capacidad de mAb anti-OX40 humano de estimular la proliferación de linfocitos T CD⁺ y la supervivencia *in vivo* y potenciar el rechazo tumoral.

El mAb anti-OX40 humano promueve la proliferación y supervivencia de linfocitos T *in vivo*.

El régimen de vacunación terapéutico se muestra en la FIG. 35A. Se implantaron por vía subcutánea (SC) 5 x 10⁵ células tumorales MC38/gp100 no pigmentadas (día 0) a ratones albinos C57BL/6 en grupos de 5. En el día 6, se indujo la linfopenia mediante la administración de una dosis de 350 cGy de radiación. En el día 7, se transfirieron adoptivamente 1 x 10⁶ linfocitos T Pmel-1 transducidos con luciferasa con o sin expresión de OX40 humano en ratones portadores de tumor (n = 5 por grupo), seguido de la inyección intravenosa de 5 x 10⁵ DC sometidas a pulsos de péptido gp100. Se administró por vía intraperitoneal IL-2 humana recombinante durante 3 días después de la transferencia de linfocitos T. Los anticuerpos se administraron en los días 7, 9 y 11 con 100, 50 y 50 µg, respectivamente, por inyección por ratón (FIG. 35B). Las imágenes de bioluminiscencia *in vivo* mostraron acumulación de linfocitos T pmel-1 CD8⁺ que expresan luciferasa en los sitios de pulmón y tumor en los días 4 y 12. Se muestran dos de los cinco ratones por grupo en el día 4 y el día 12 (FIG. 35C). Los tumores respondieron a los tratamientos usando mAb anti-hOX40. El tamaño del tumor se midió cada 3 días. Pmel-1 y Pmel-1 más IgG1 de ratón sirvieron como control.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> ANTICUERPOS ANTI-OX40 Y PROCEDIMIENTOS DE USO DE LOS MISMOS

<130> UTFC.P1193WO

5 <140>

<141>

<150> 61/380.827

<151> 08/09/2010

<150> 61/375.999

10 <151> 23/08/2010

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 1

Asp Tyr Ser Met His
1 5

<210> 2

20 <211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
1 5 10 15

25 Gly

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus sp.

30 <400> 3

Pro Tyr Tyr Asp Tyr Val Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 122

<212> PRT

ES 2 649 155 T3

<213> Mus sp.

<400> 4

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

5 <210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 5

ES 2 649 155 T3

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

<210> 6

<211> 458

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 6

actagtacca ccatggcttg ggtgtggacc ttgctattcc tgatggcagc tgcccaaagt	60
atccaagcac aggttcagtt ggtgcagtct ggatctgagc tgaagaagcc tggagcctca	120
gtcaaggttt cctgcaaggc ttctggttat accttcacag actattcaat gcactgggtg	180
cgacaggctc caggacaagg tttaaagtgg atgggctgga taacactga gactggtgag	240
ccaacatatg cagatgactt caagggacgg tttgtcttct ctttggacac ctctgtcagc	300
actgcctatt tgcagatcag cagcctcaaa gctgaggaca cggctgtgta ttactgtgct	360
aatccctact atgattacgt ctcttactat gctatggact actgggggtca ggaaccacg	420
gtcaccgtct cctcaggtaa gaatggcctc tcaagctt	458

10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 7

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

5 <210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 8

10 Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

15 <400> 9

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr

1 5

<210> 10

<211> W7

20 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 10

ES 2 649 155 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Arg
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

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

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

10

ES 2 649 155 T3

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

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

<210> 12

<211> 416

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 12

gctagcacca ccatggagtc acagattcag gtctttgtat tcgtgtttct ctggttgtct	60
gggtgttgacg gagacattca gatgaccag tctccatcct cctgtccgc atcagtggga	120
gacaggggtca ccatcacctg caaggccagt caggatgtga gtactgctgt agcctggat	180
caacagaaac caggaaaagc ccctaaacta ctgatttact cggcatccta cctctacact	240
ggagtccctt cacgcttcag tggcagtgga tctgggacgg atttcacttt caccatcagc	300
agtctgcagc ctgaagacat tgcaacatat tactgtcagc aacattatag tactcctcgg	360
acgttcggtc agggcaccaa gctggaaatc aaacgtaagt agaatccaaa gaattc	416

10 <210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 13

Ser His Asp Met Ser
1 5

15

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

20 <400> 14

Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met Glu
1 5 10 15

Arg

ES 2 649 155 T3

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

5 <400> 15

His Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

10 <213> Mus sp.

<400> 16

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ser Asn Glu Tyr Glu Phe Pro Ser His
20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Lys Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

Ala Ala Ile Asn Ser Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Met
50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 17

<211> 120

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 649 155 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 17

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

5 <210> 18

<211> 451

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 18

actagtacca ccatggactt cgggctcagc ttggttttcc ttgtccttat tttaaaaagt 60
 gtacagtgtg aggtgcagct ggtggagtct gggggaggct tagtgcagcc tggaggggcc 120
 ctgagactct cctgtgcagc ctctgaatac gagttccctt cccatgacat gtcttgggctc 180
 cgccaggctc cggggaaggg gctggagttg gtcgcagcca ttaatagtga tgggtggtagc 240
 acctactatc cagacaccat ggagagacga ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac 300
 tctactgtacc tgcaaatgaa cagtctgagg gccgaggaca cagccgtgta ttactgtgca 360
 agacactatg atgattacta cgcttggttt gcttactggg gcccaaggac tatgggtcact 420
 gtctcttcag gtgagtccta acttcaagct t 451

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus sp.

5 <400> 19

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10 15

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Mus sp.

<400> 20

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 1 5

<210> 21

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 21

Gln His Ser Arg Glu Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 22

20 <211> 111

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 22

ES 2 649 155 T3

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

<210> 23

<211> 111

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 23

ES 2 649 155 T3

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

<210> 24

<211> 428

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 24

```

gctagcacca ccatggagac agacacactc ctggtatggg tactgctgct ctgggttcca      60
ggttccactg gtgaaattgt gctgacacag tctcctgcta cttatcttt gtctccaggg      120
gaaagggcca ccctctcatg cagggccagc aaaagtgtca gtacatctgg ctatagttat      180
atgcactggt accaacagaa accaggacag gctcccagac tcctcatcta tcttgcattc      240
aacctagaat ctgggggtccc tgccagggtc agtggcagtg ggtctgggac agacttcacc      300
ctcaccatca gcagcctaga gcctgaggat tttgcagttt attactgtca gcacagtagg      360
gagcttccgc tcacgttcgg cggagggacc aaggtcgaga tcaaacgtaa gtacactttt      420
ctgaattc                                     428
  
```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, que se une al OX40 humano, que comprende: (a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13; (b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14; (c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15; (d) una región variable de cadena ligera CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19; (e) una región de dominio variable de cadena ligera CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 y (f) una región variable de cadena ligera CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21.
2. Un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 22 y una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16.
3. Un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo aislado es un anticuerpo monoclonal.
4. Un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo aislado es un anticuerpo humanizado.
5. Un anticuerpo humanizado aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 y una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia al menos 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.
6. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
8. Un procedimiento para producir un anticuerpo, o porción de unión a antígeno del mismo, que comprende la etapa de cultivar la célula huésped de la reivindicación 7, comprendiendo además el procedimiento preferentemente recuperar el anticuerpo o porción de unión a antígeno de la célula huésped.
9. Un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso como un medicamento.
10. Un anticuerpo aislado, o porción de unión a antígeno del mismo, para uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el medicamento es para uso en el tratamiento del cáncer.

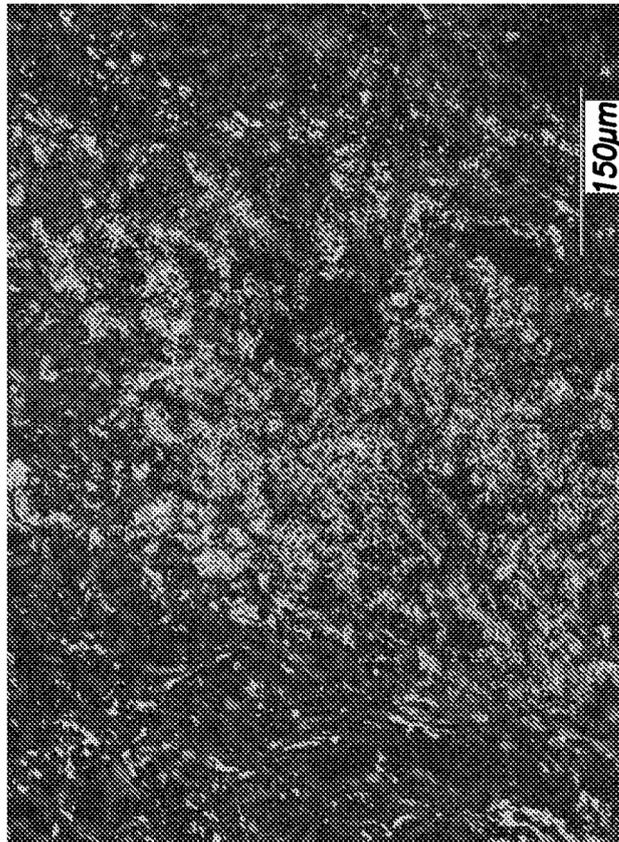
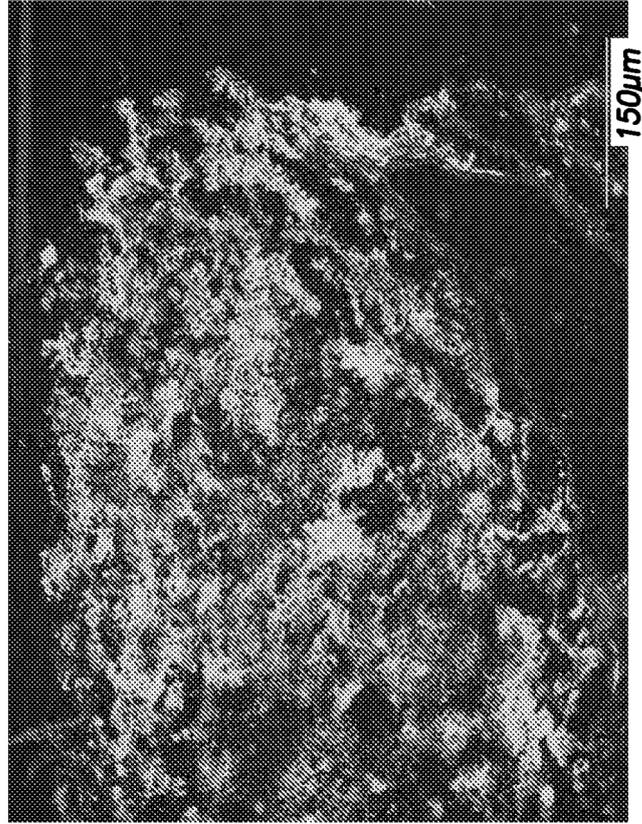


FIG. 1

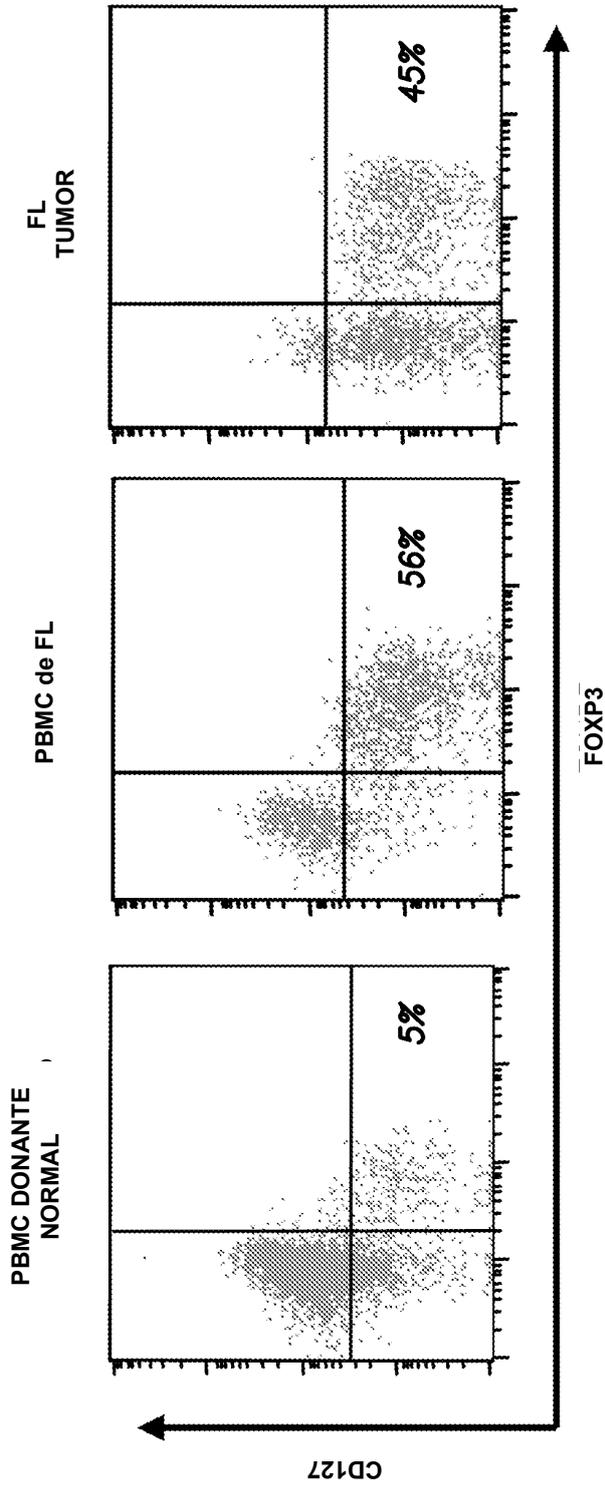


FIG.2A

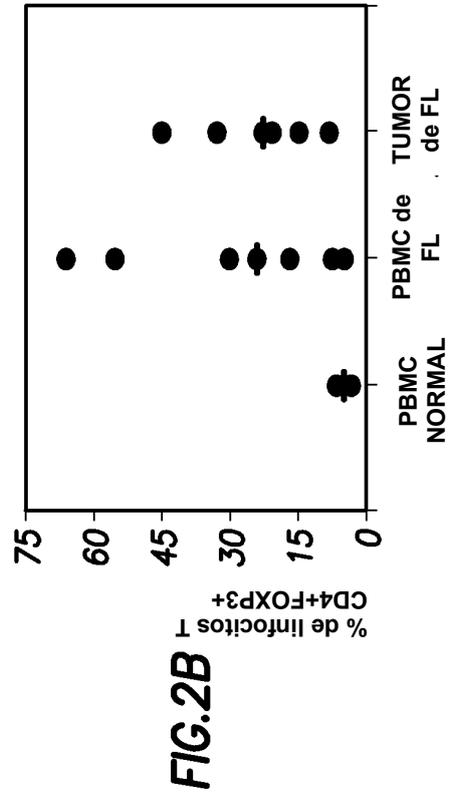


FIG.2B

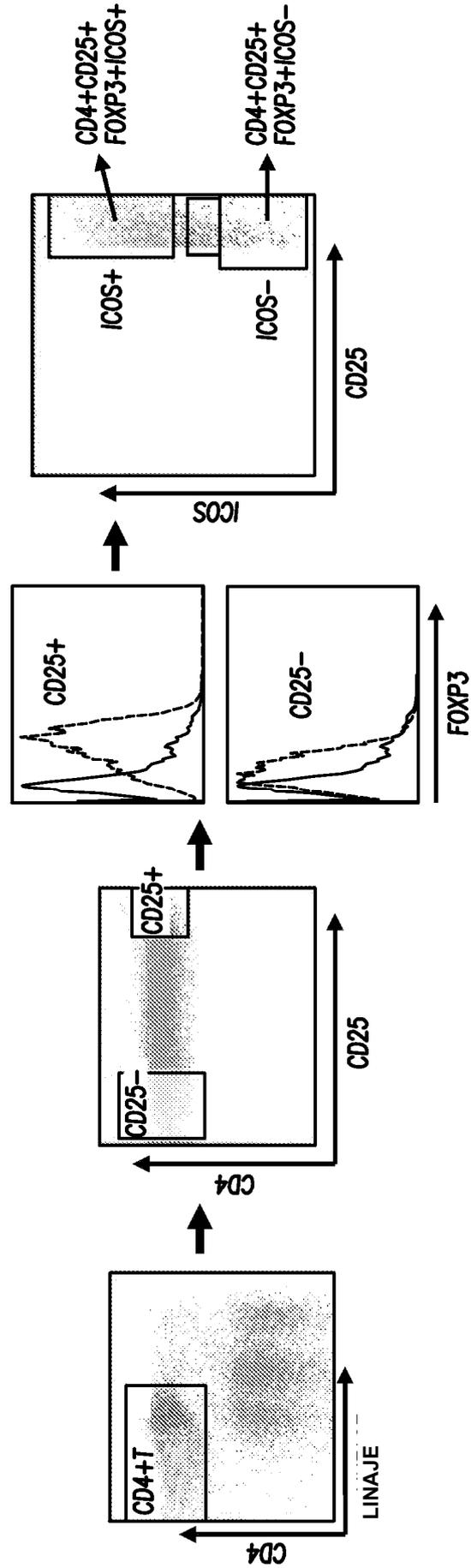


FIG.3

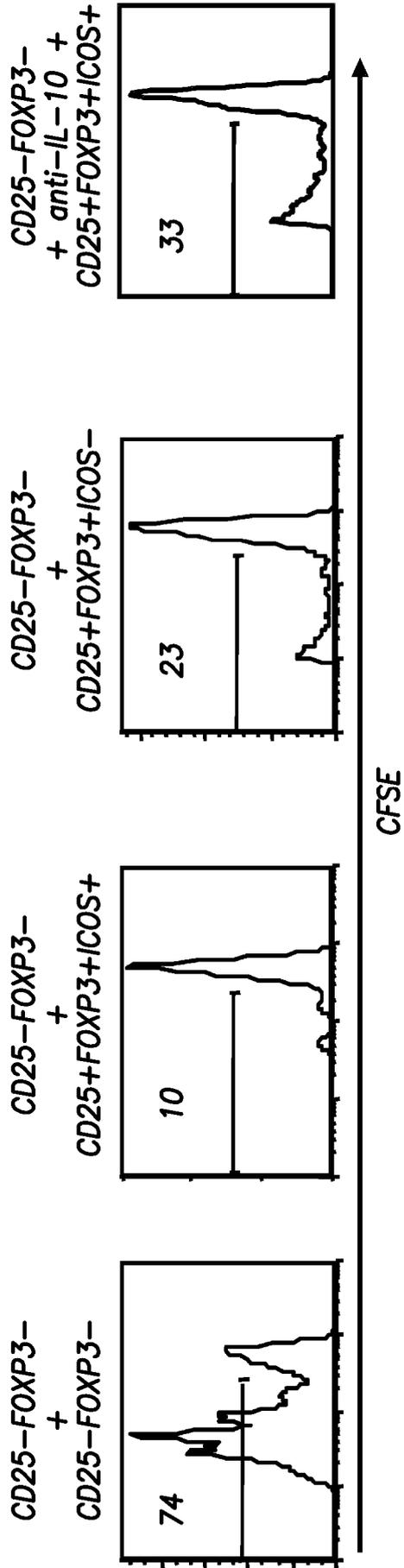


FIG.4

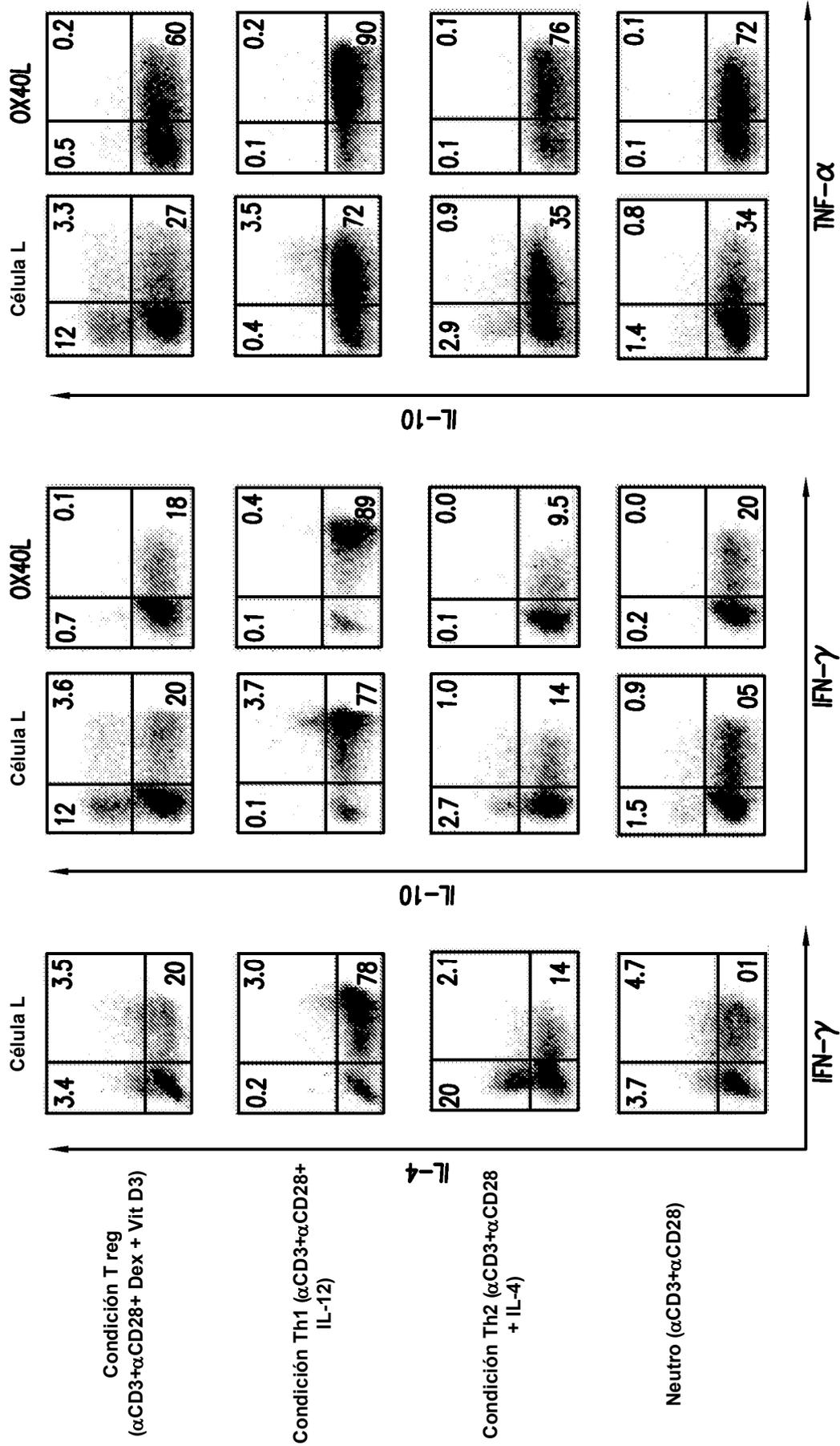


FIG.5A

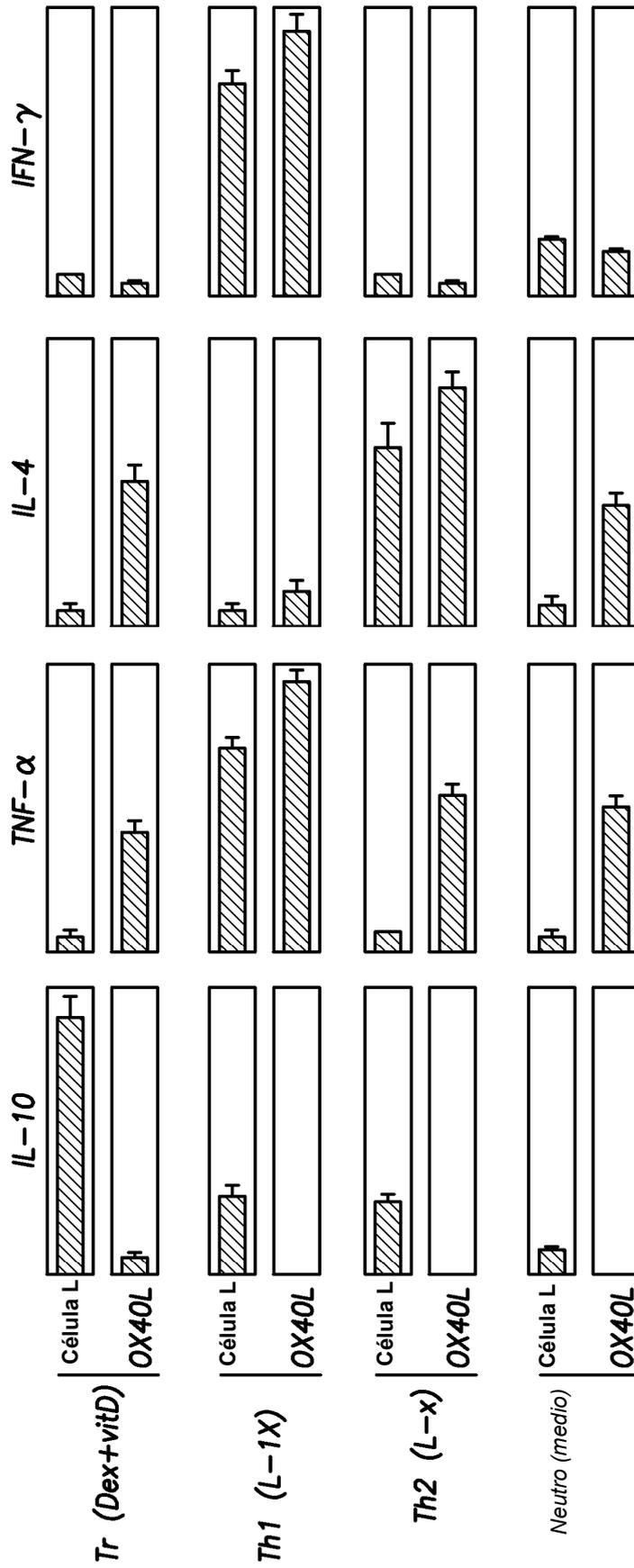


FIG.5B

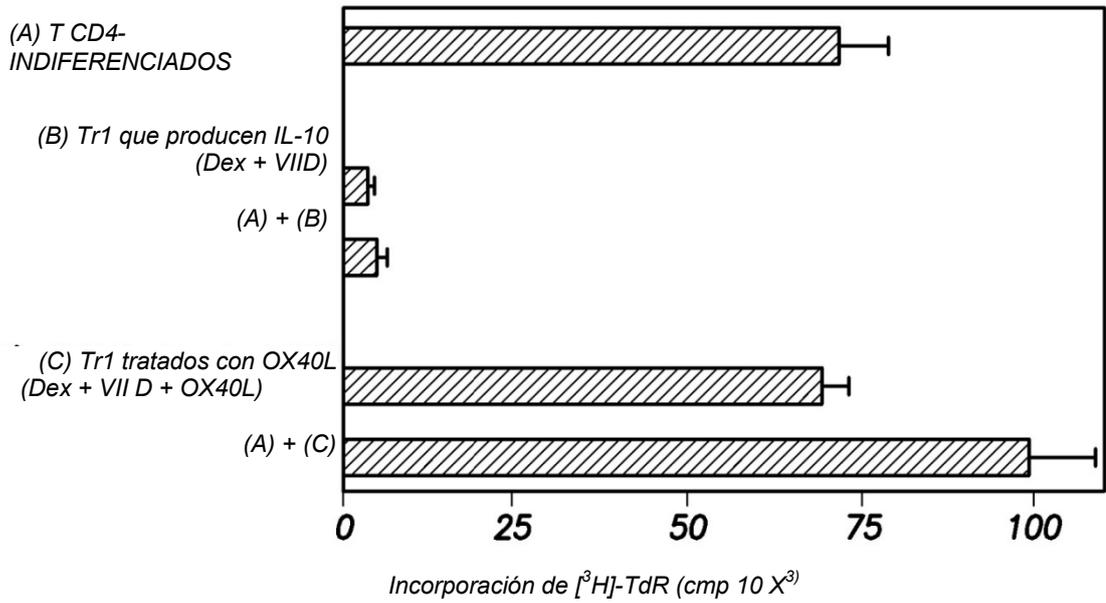


FIG.5C

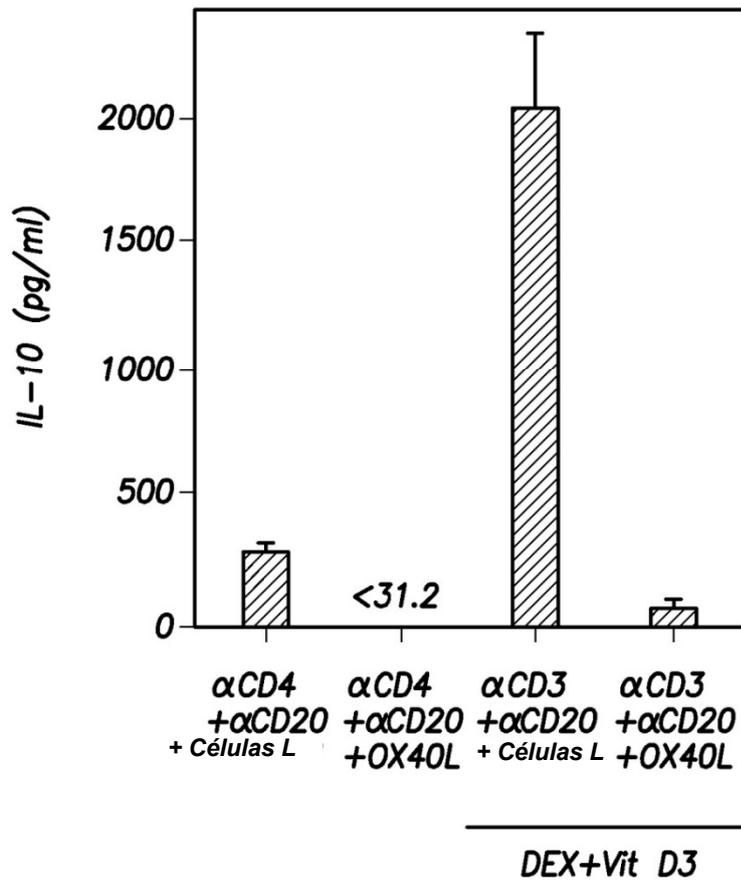
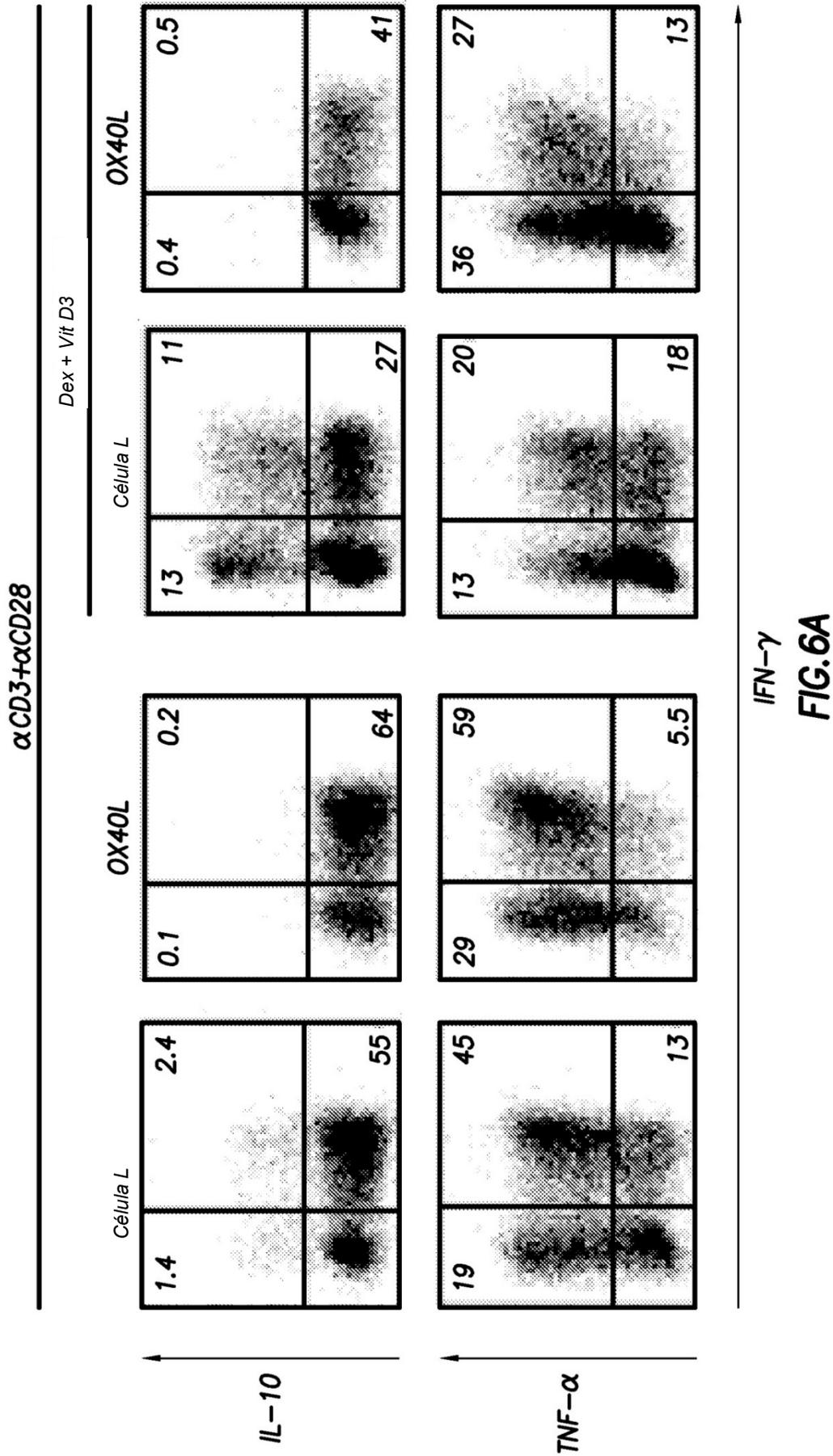
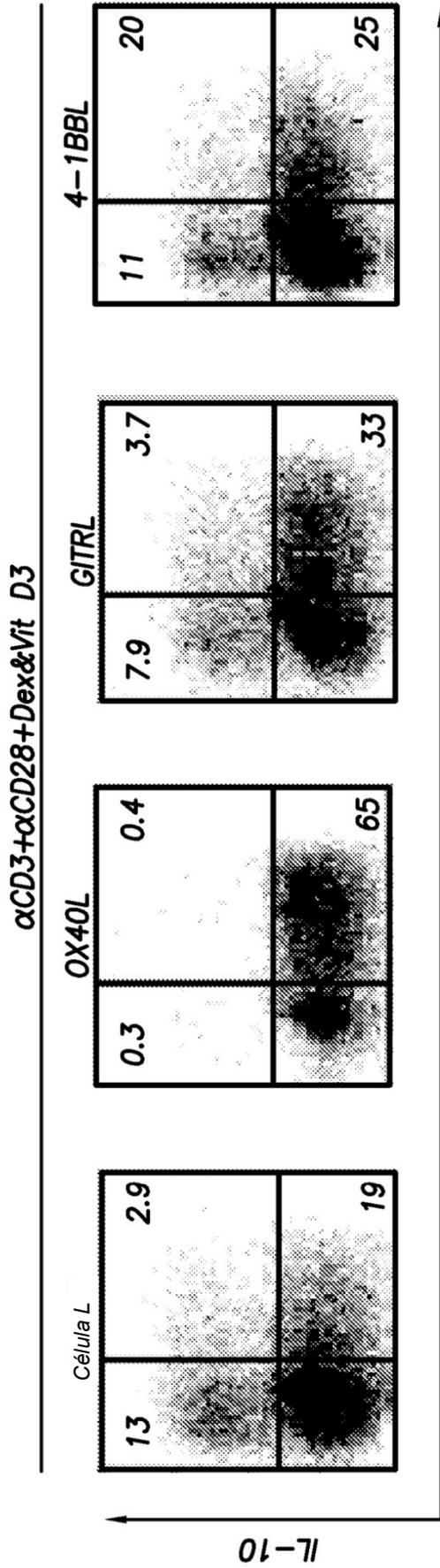


FIG.6B





TNF- α
FIG.7A

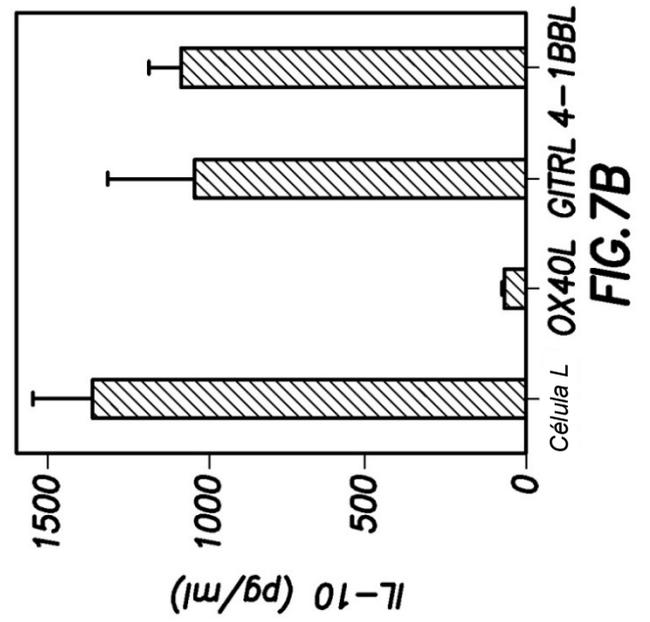


FIG.7B

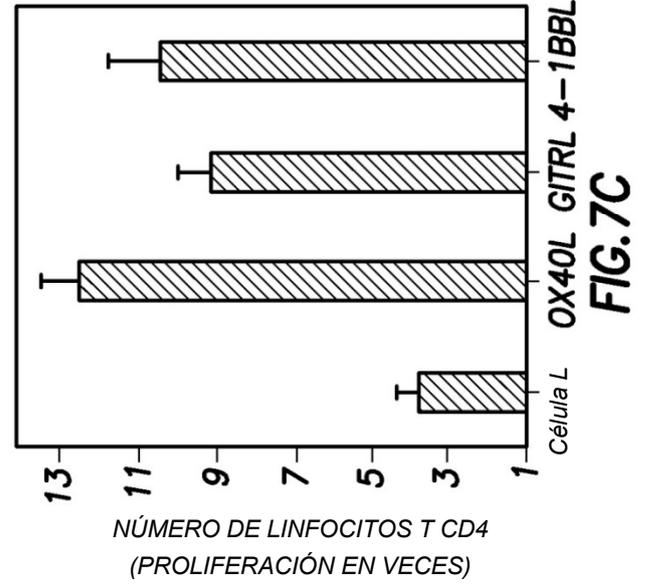
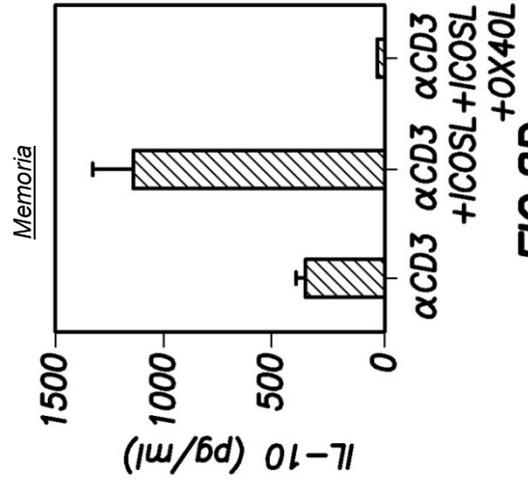
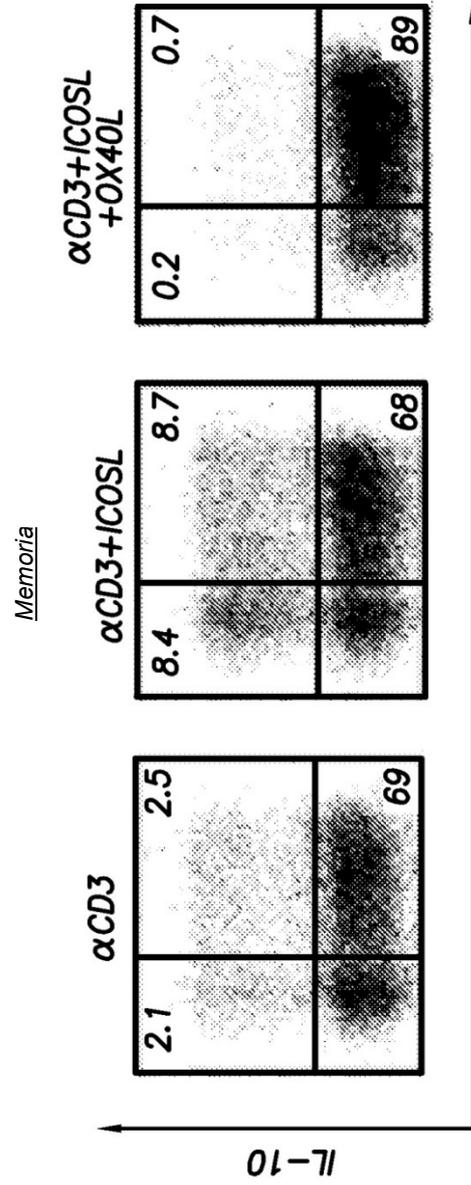
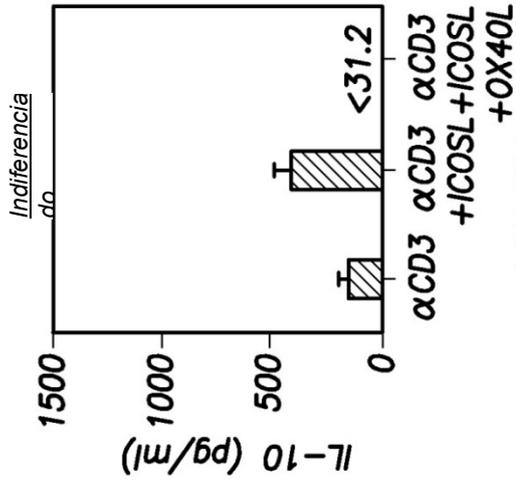
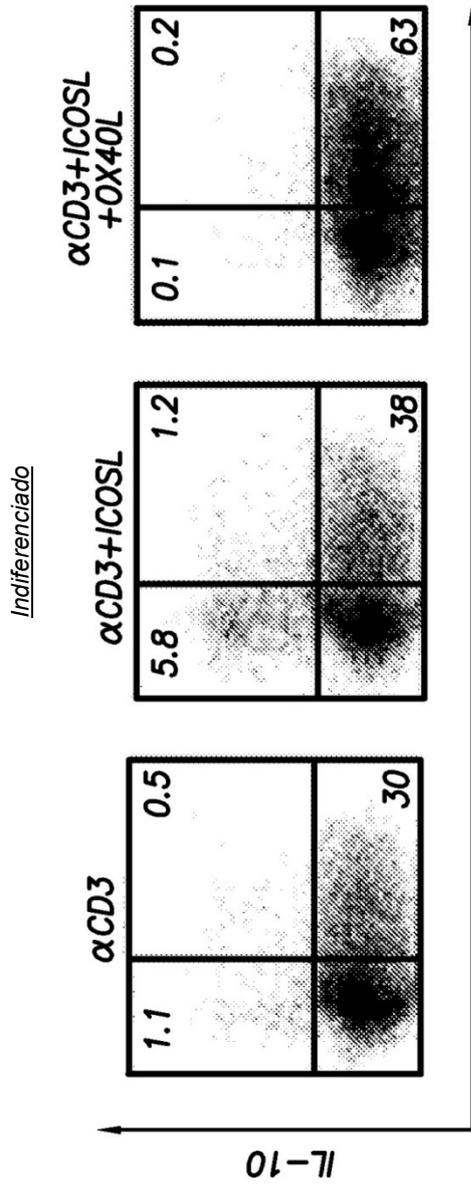
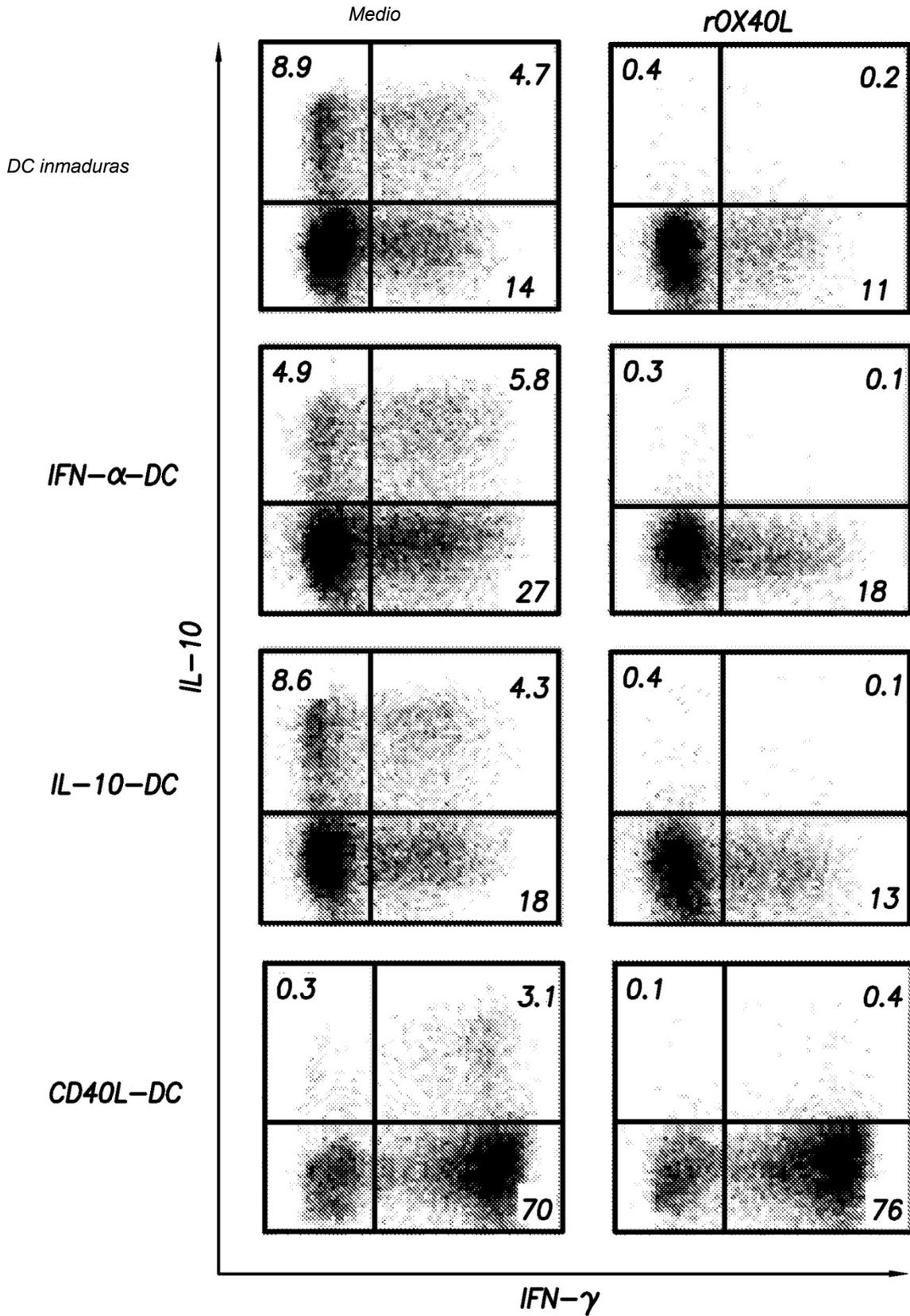


FIG.7C





IFN- γ
FIG.8E

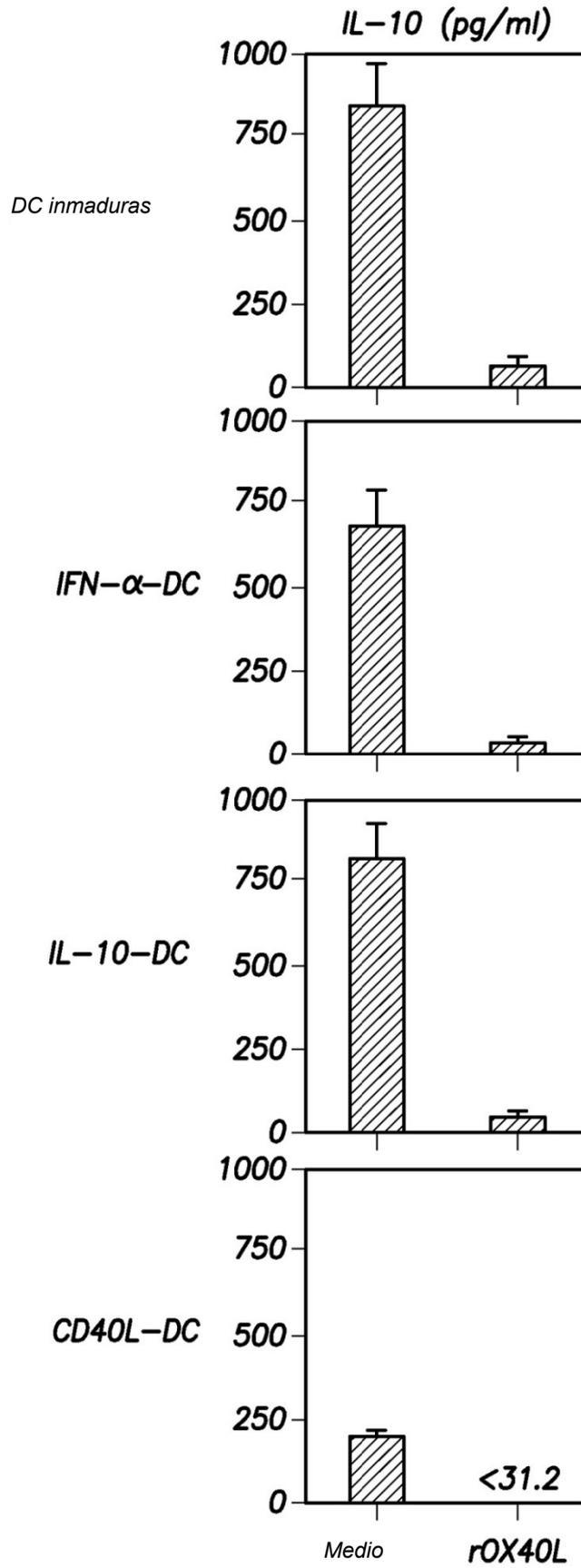


FIG.8F

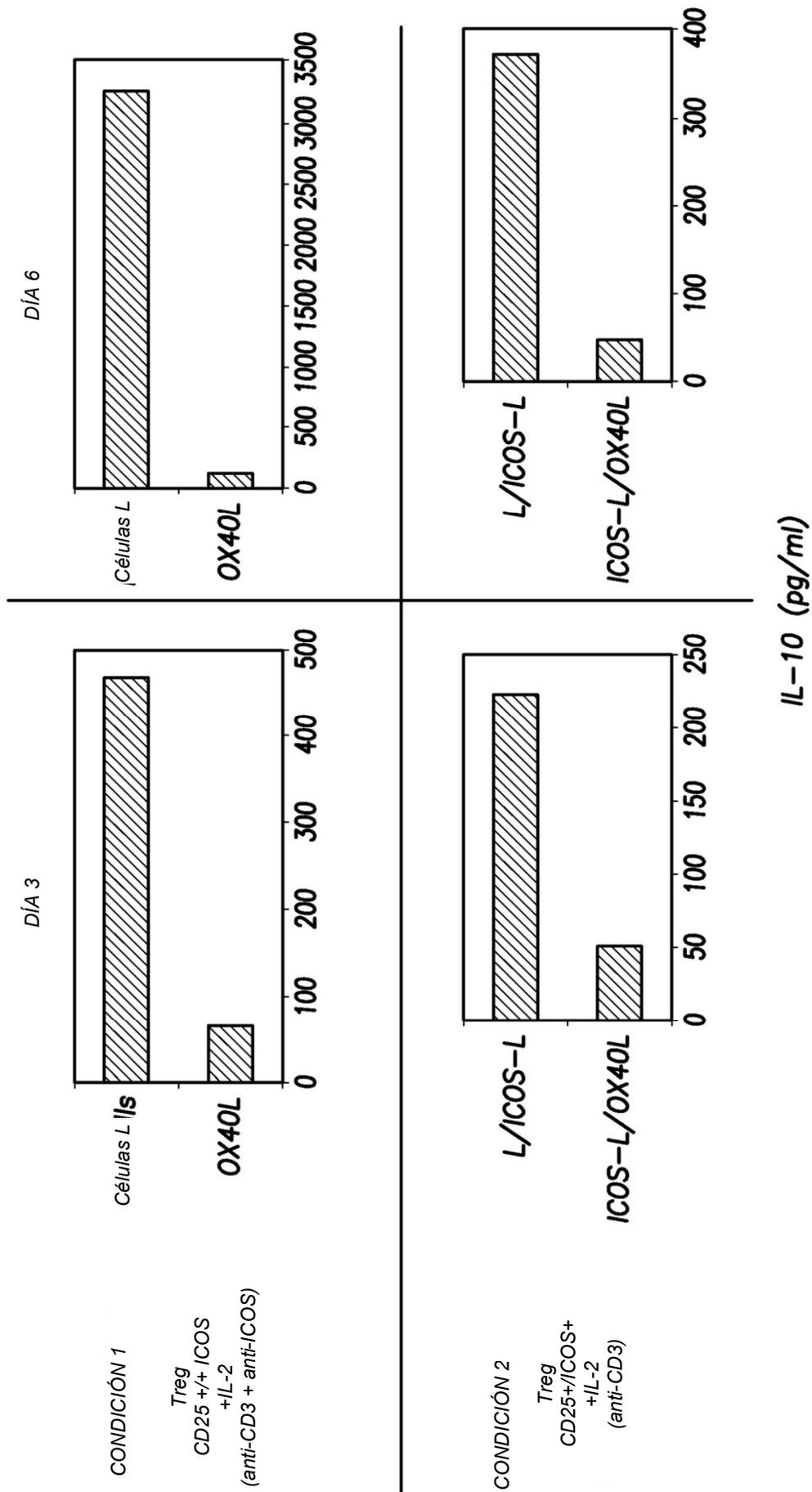


FIG.9

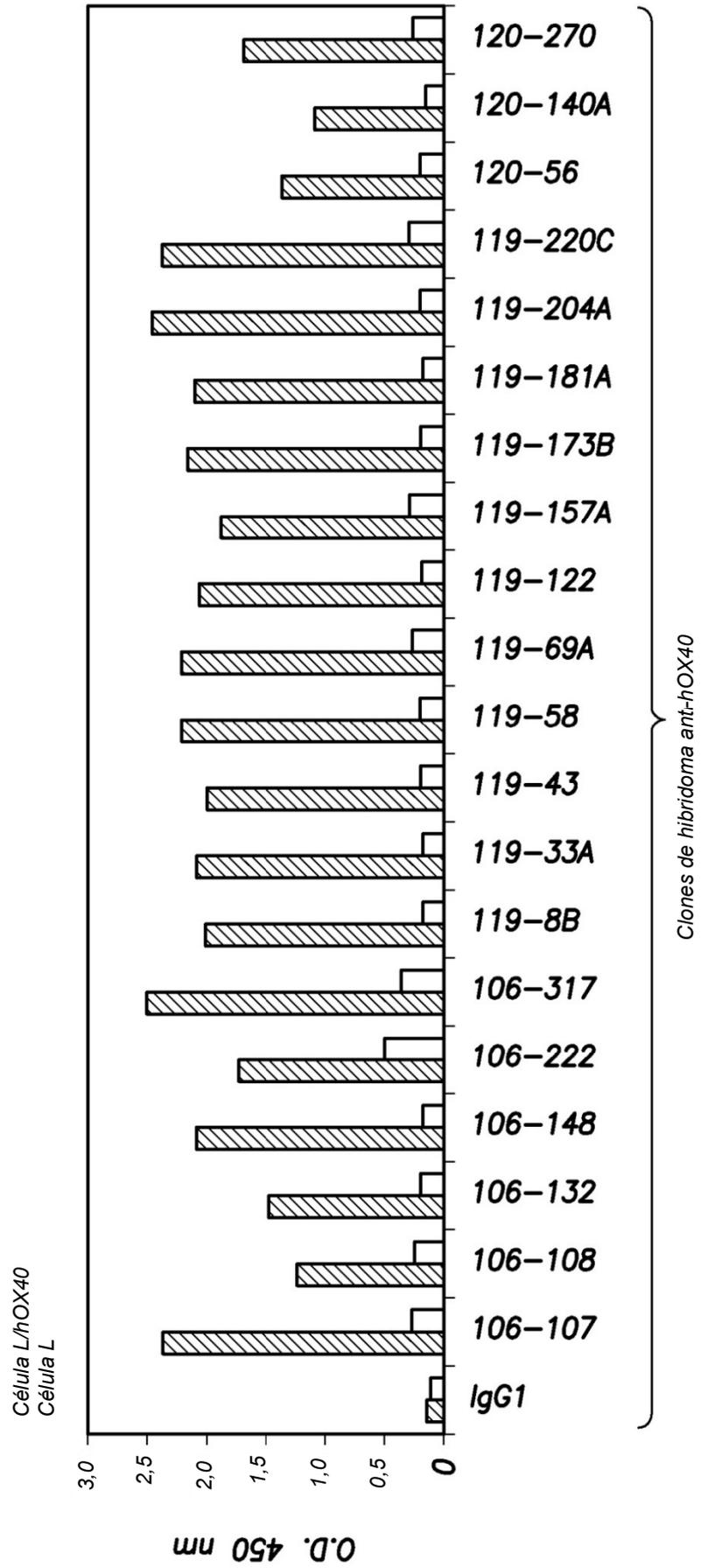


FIG.10

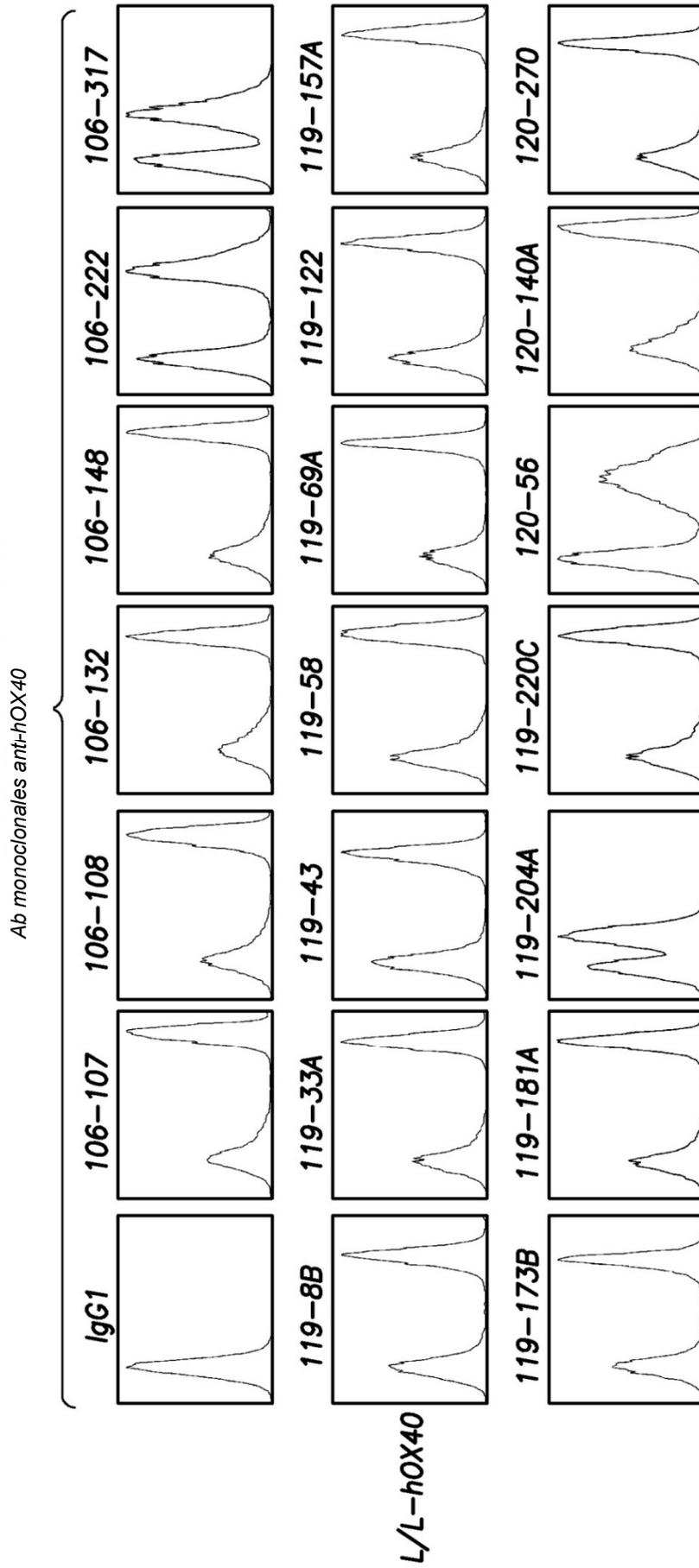


FIG.11

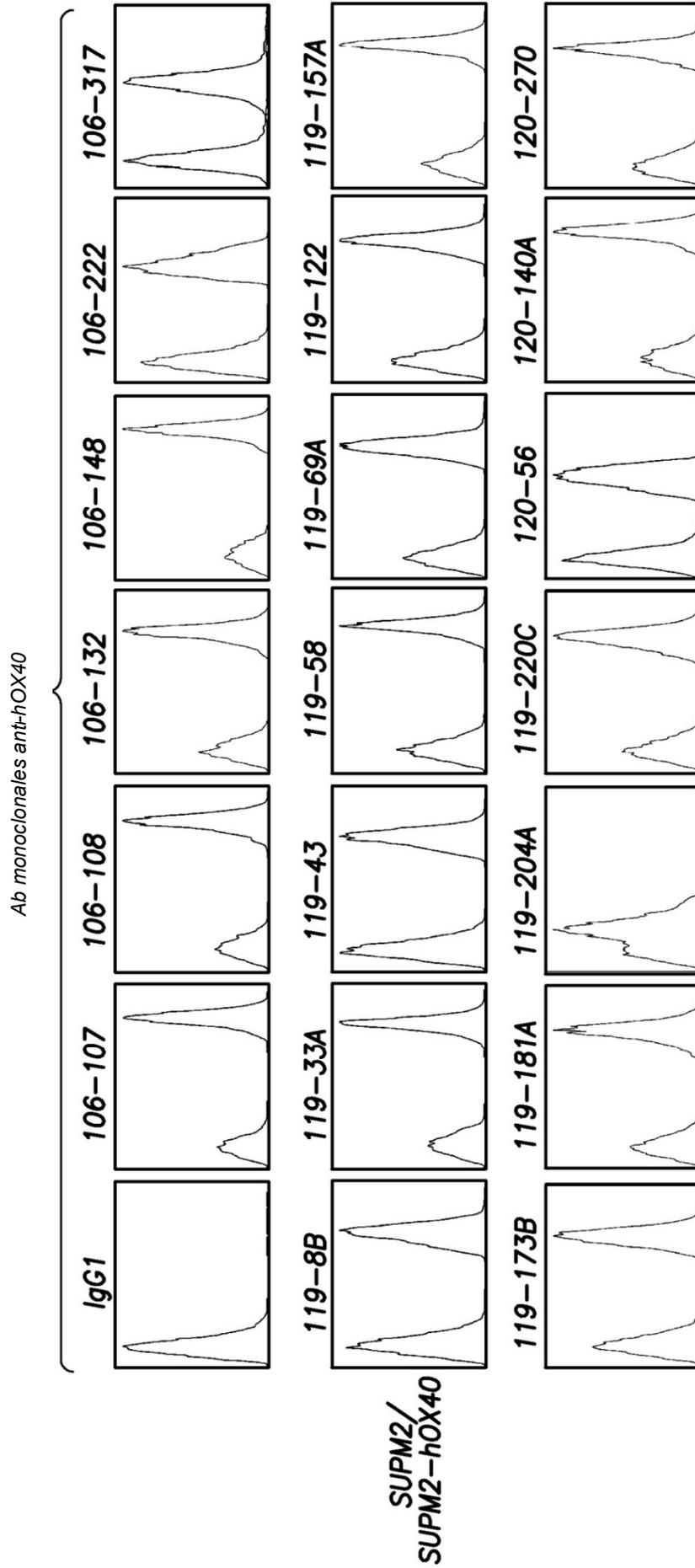


FIG.12

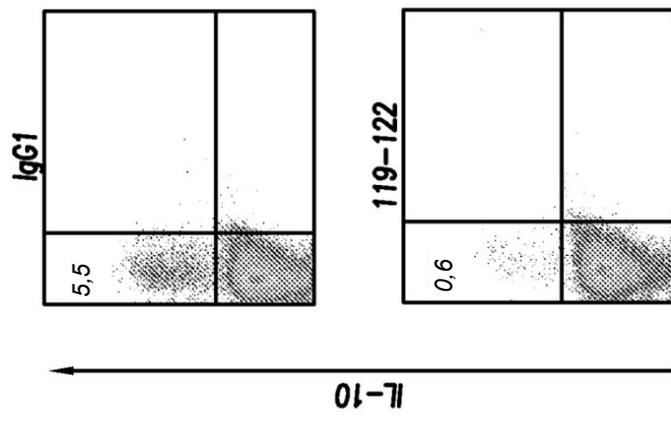
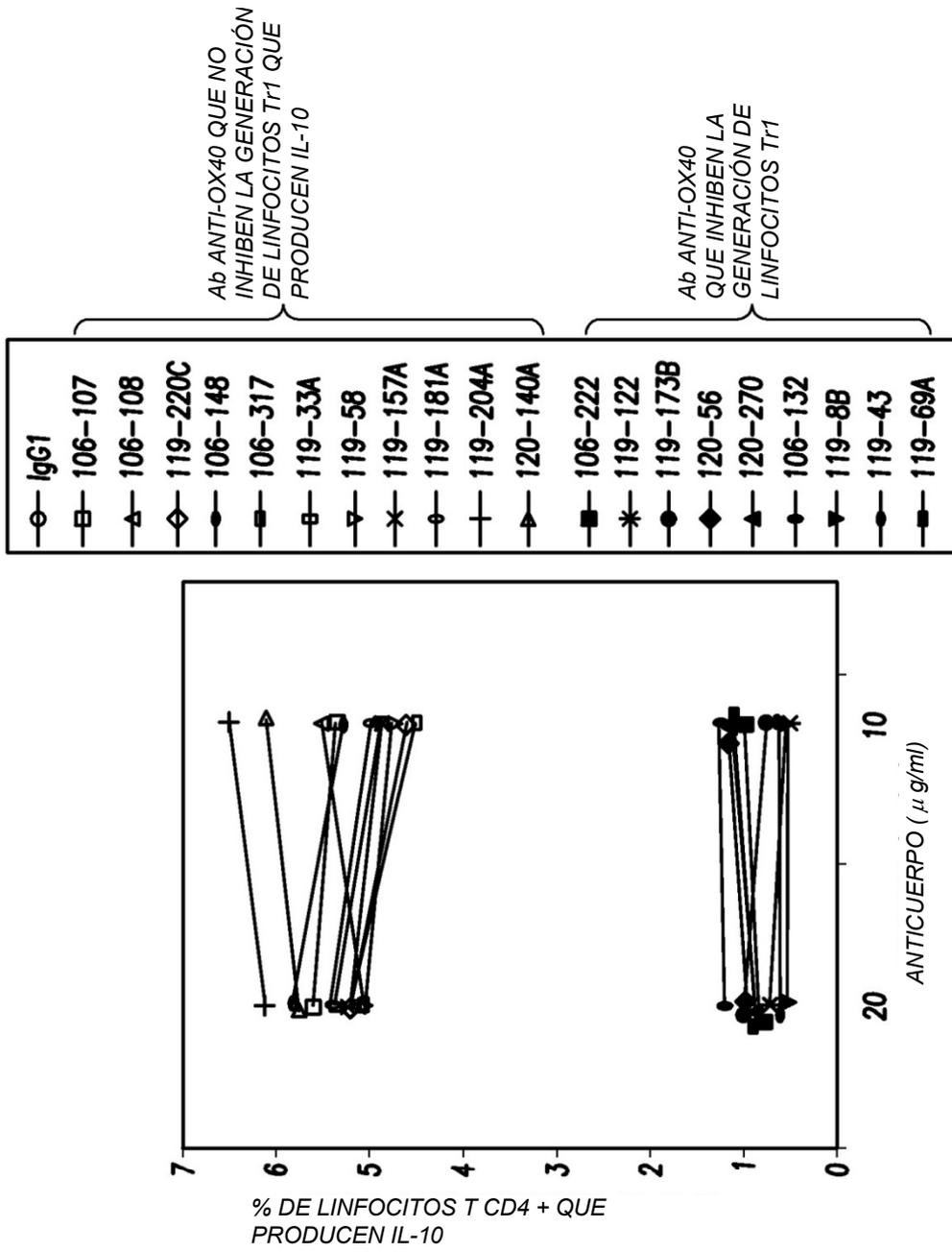


FIG. 13A

FIG. 13B

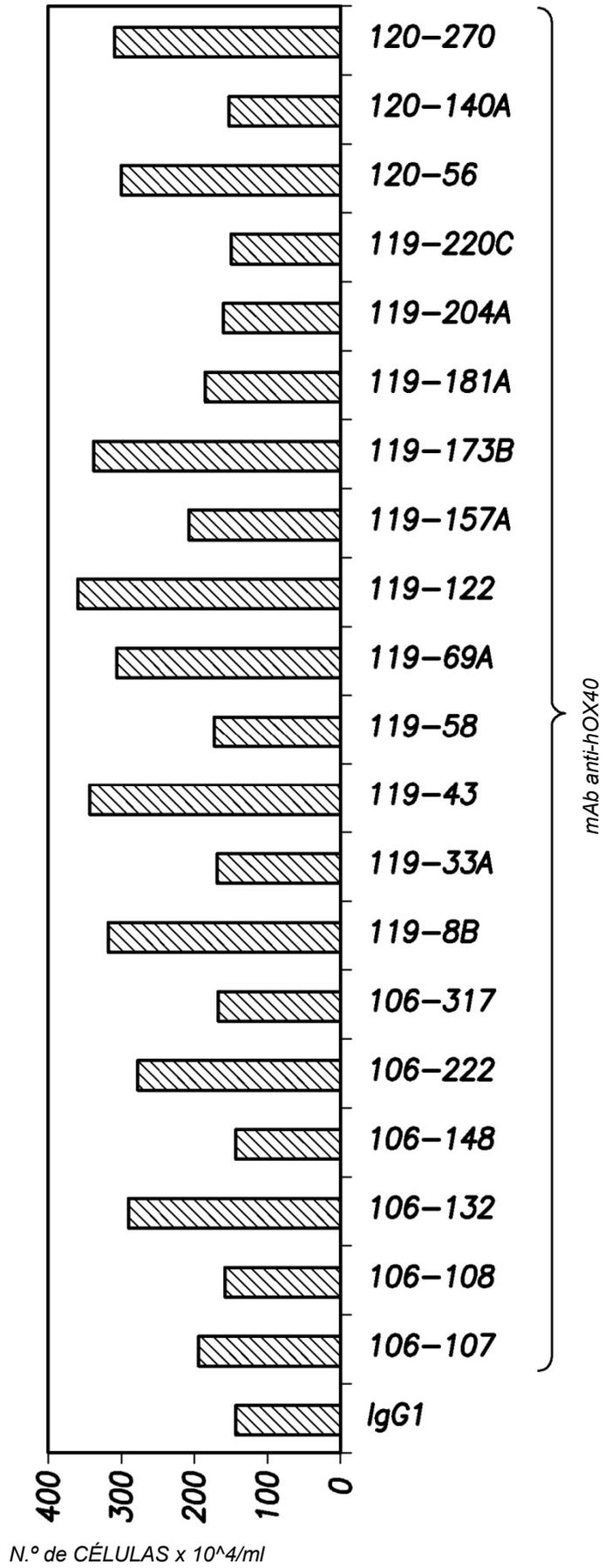


FIG. 14

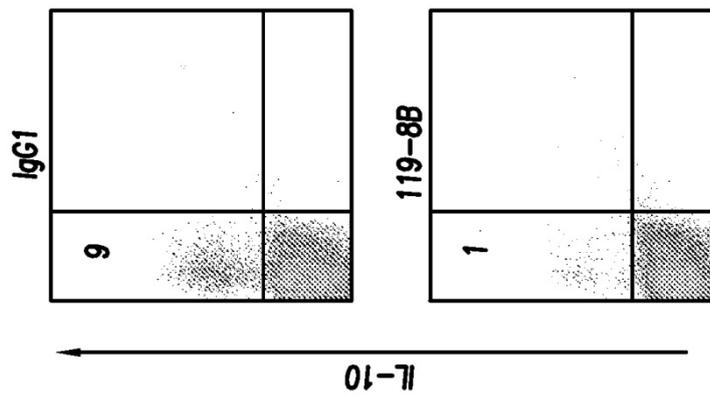


FIG.15A

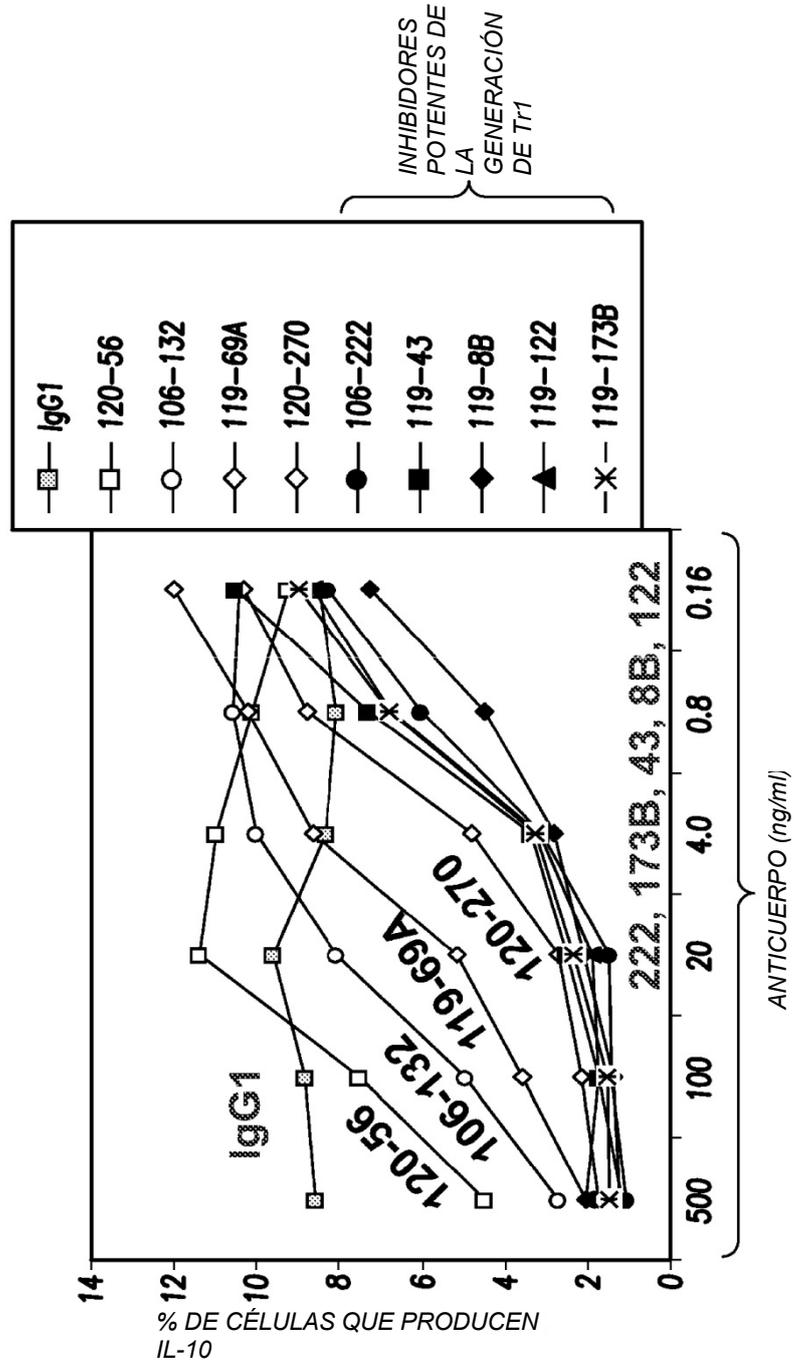


FIG.15B

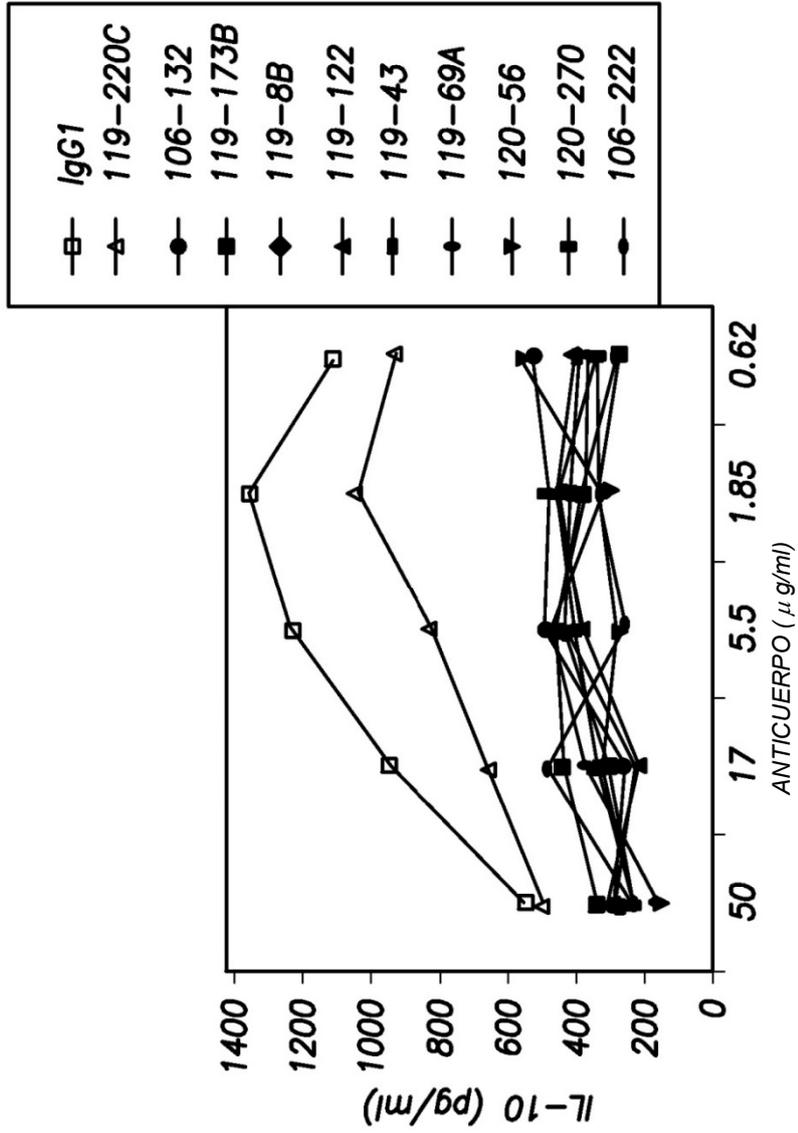


FIG. 16B

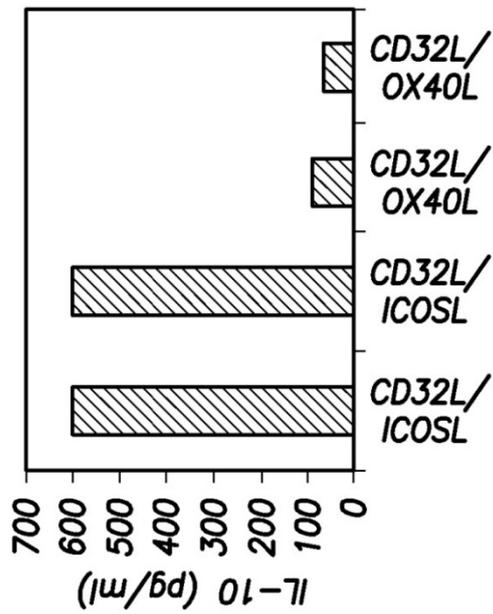


FIG. 16A

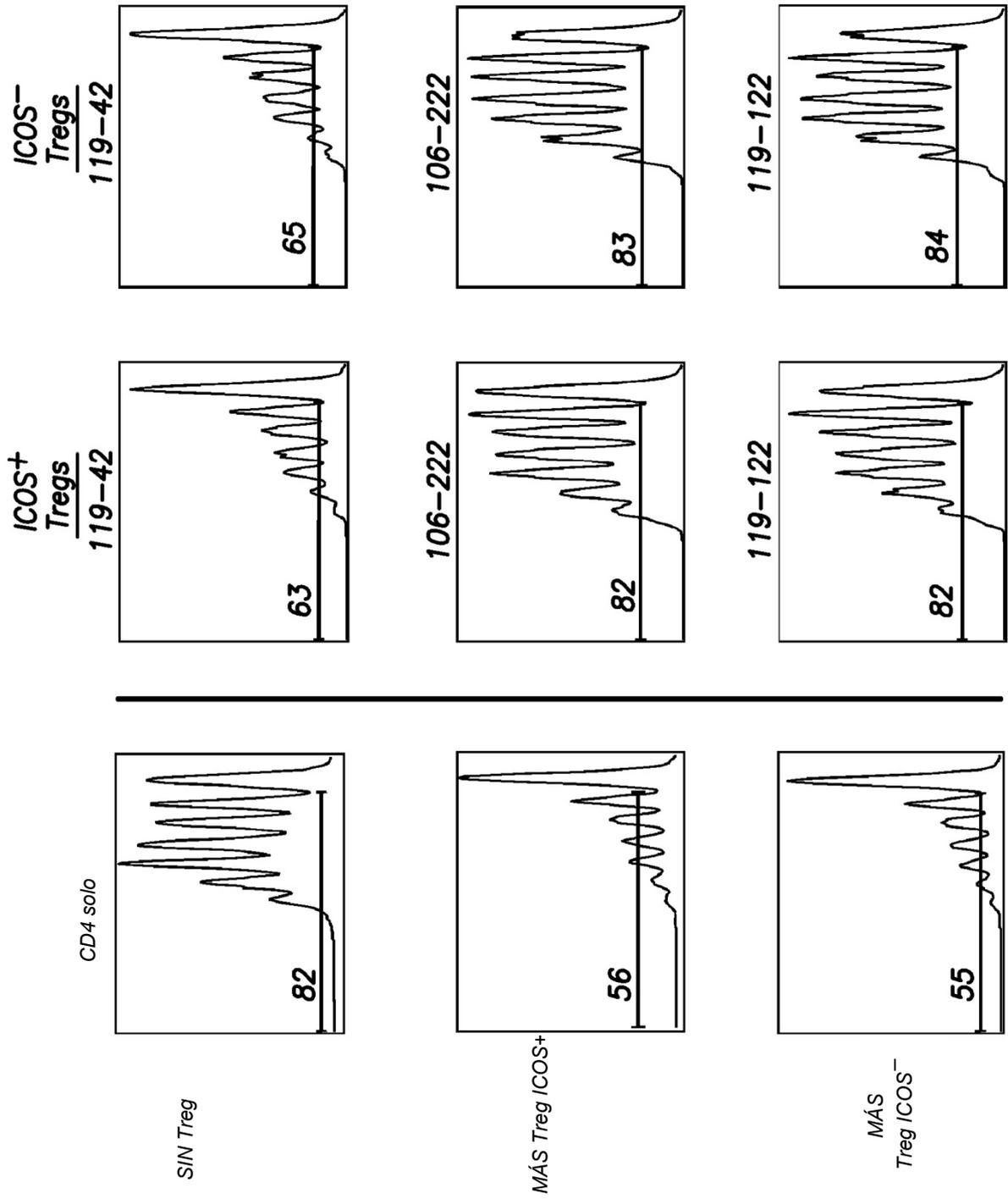


FIG.16C

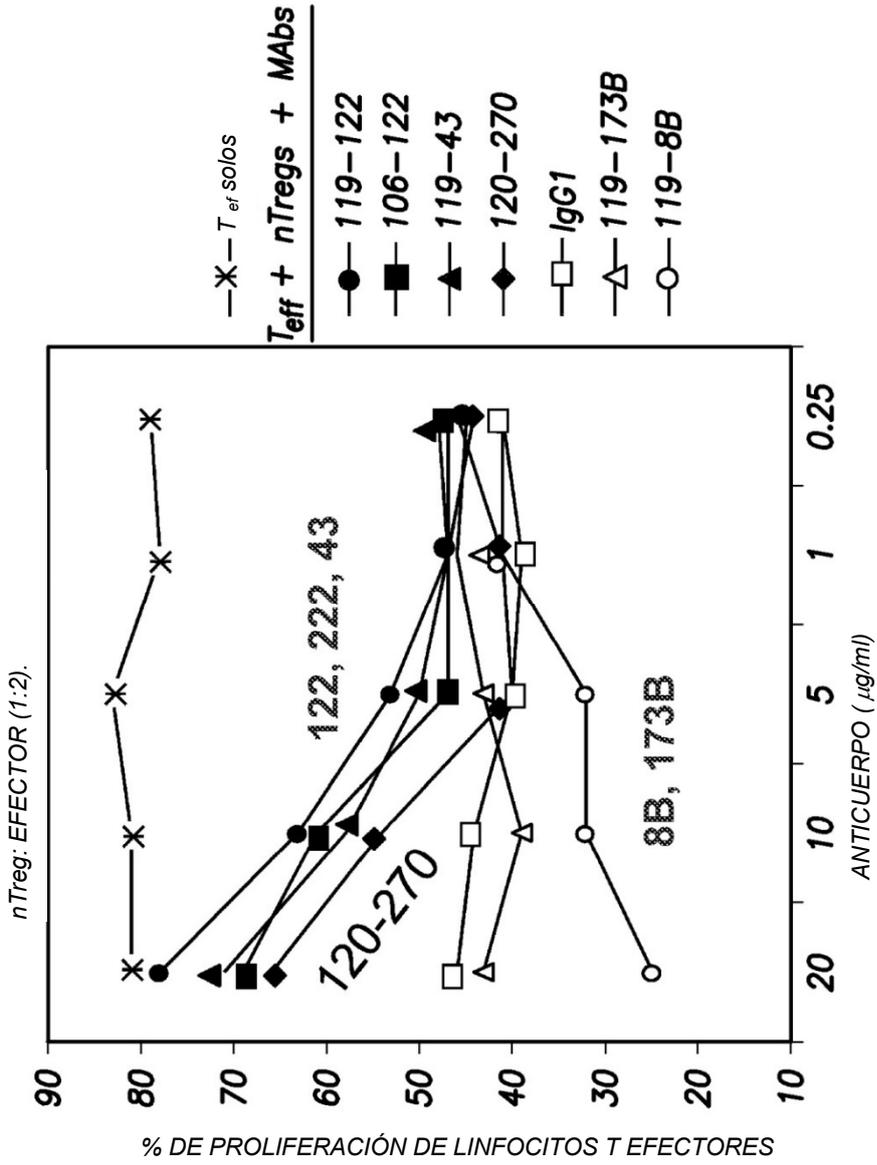


FIG.17B

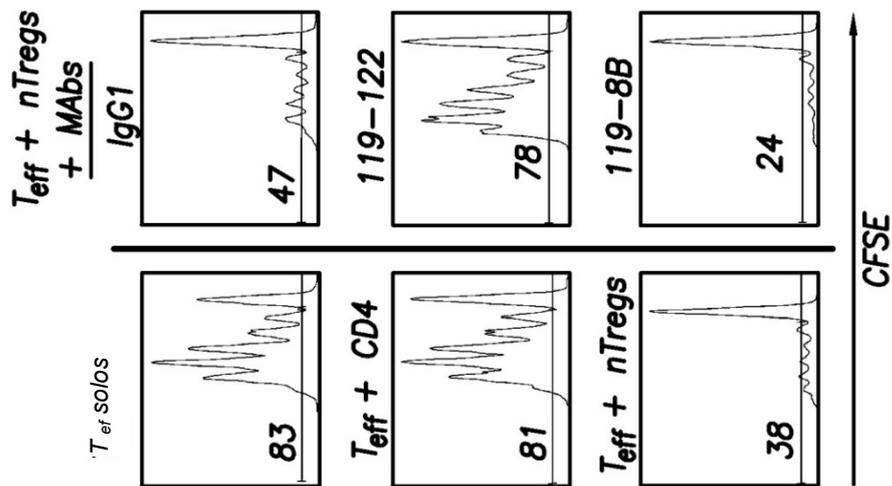


FIG.17A

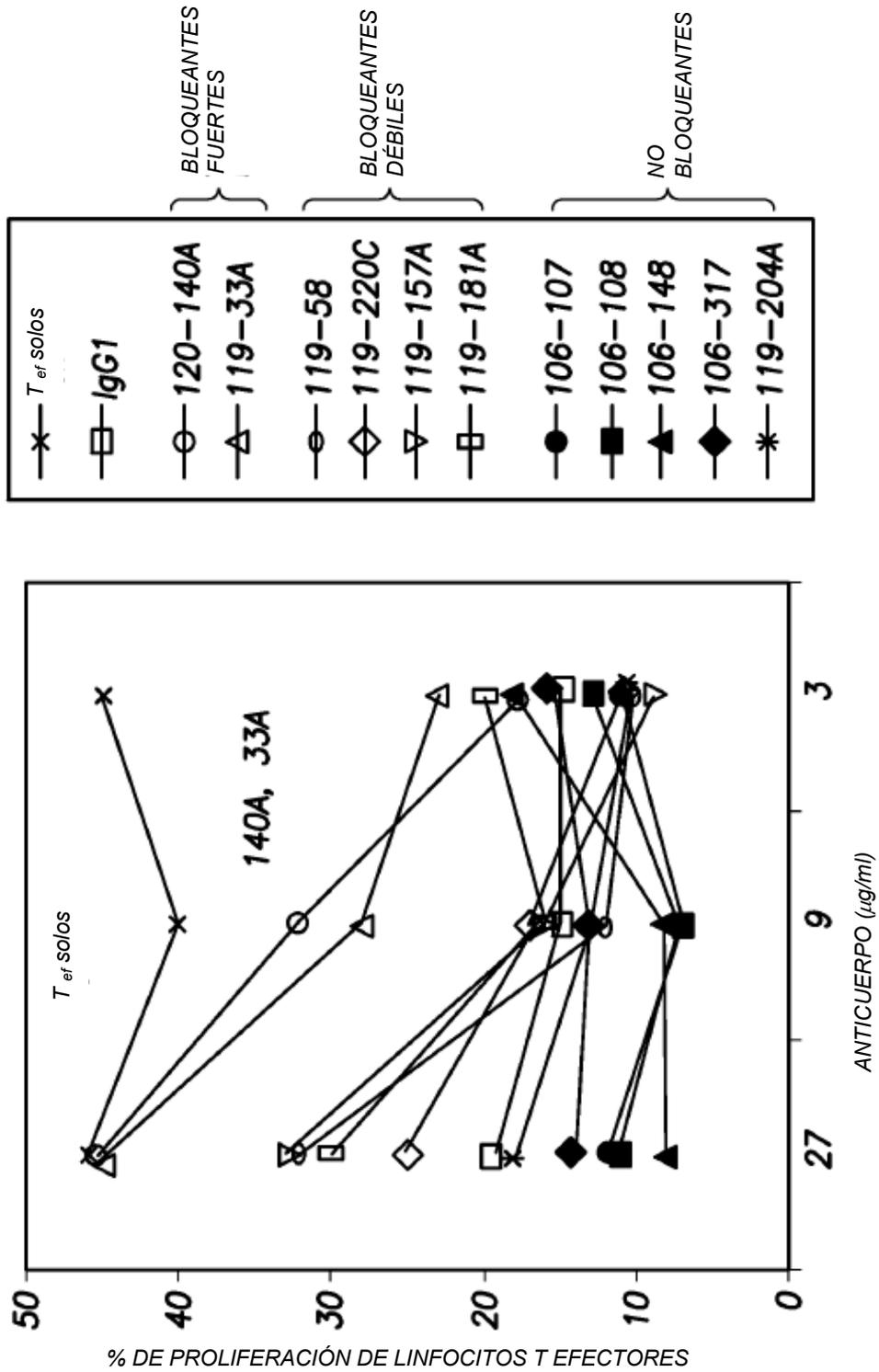


FIG. 18

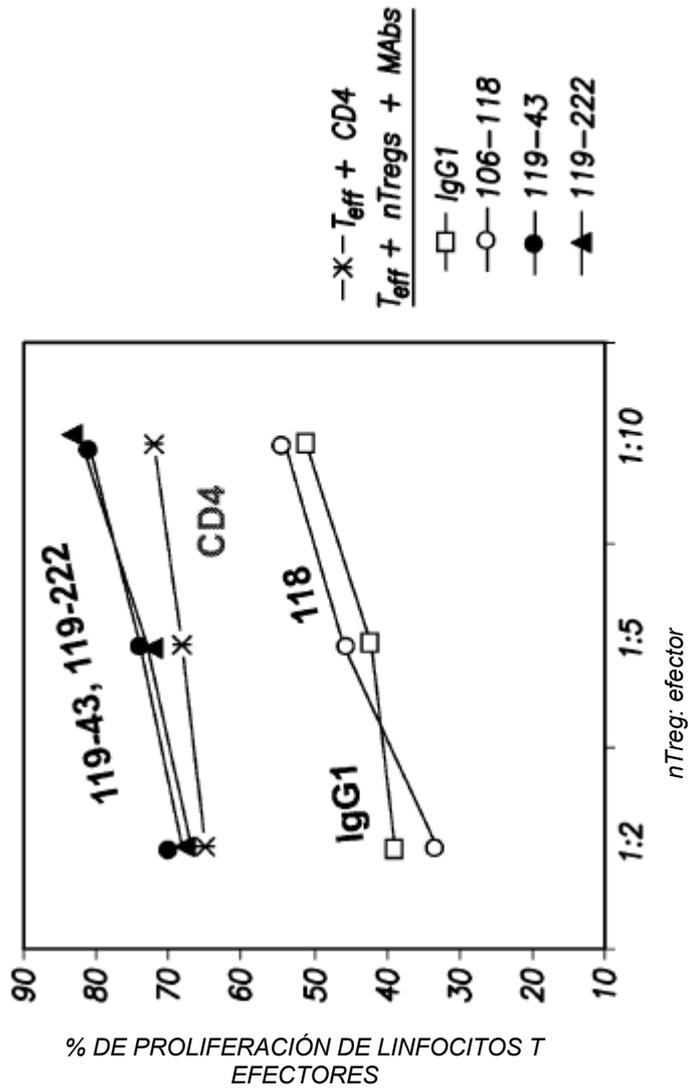


FIG. 19B

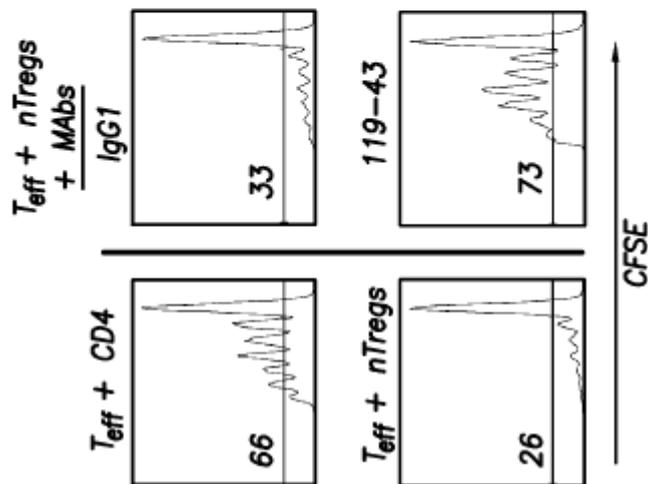


FIG. 19A

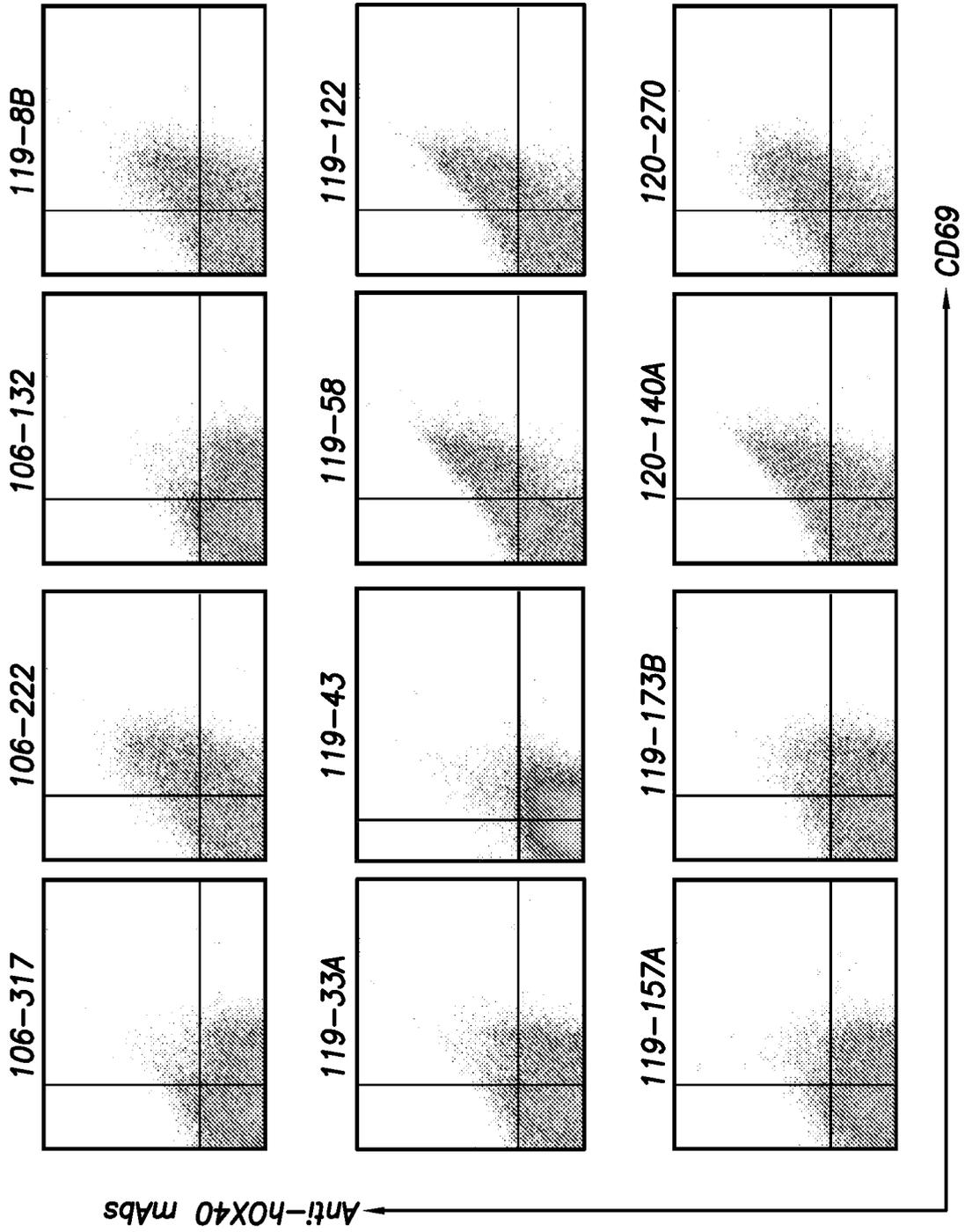


FIG.20

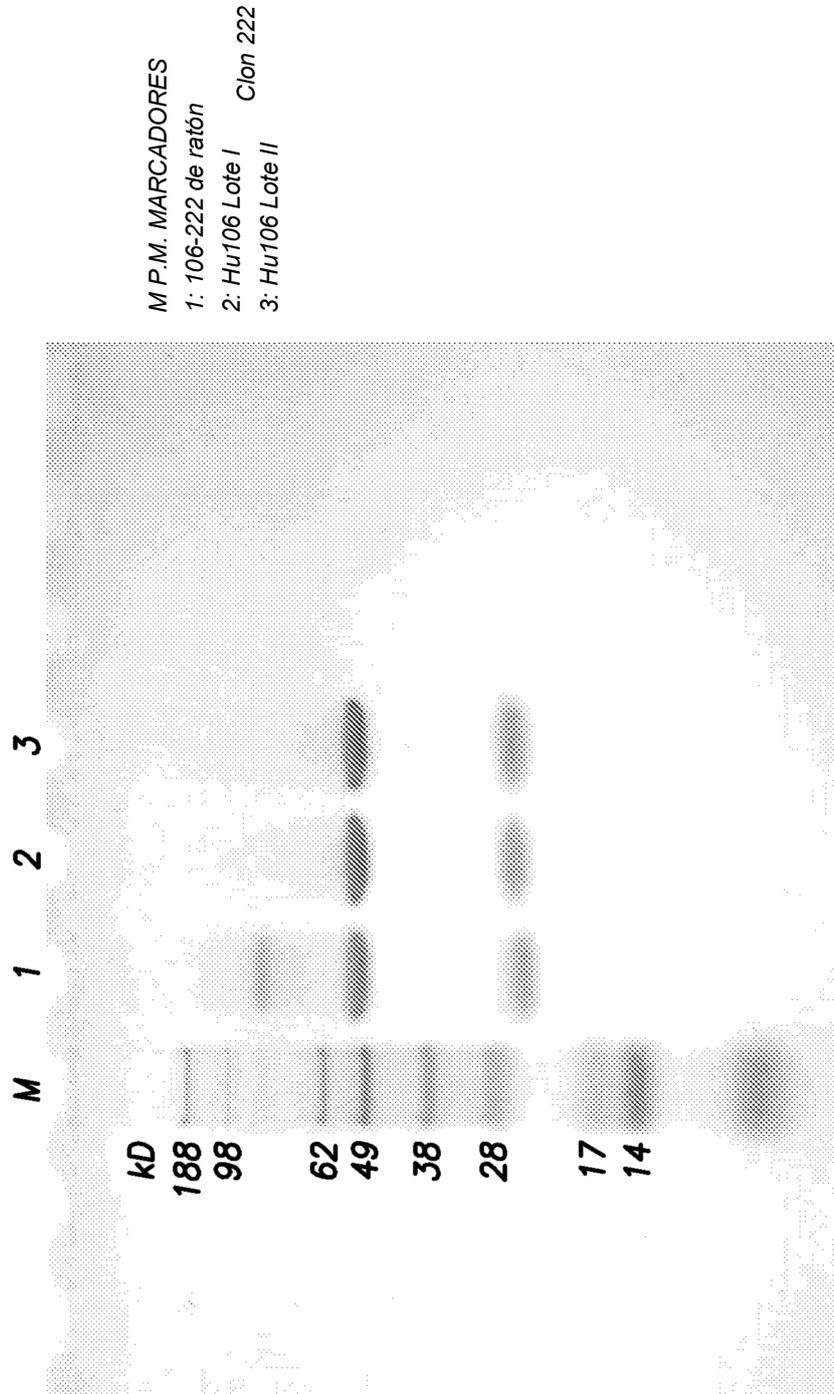


FIG.21

UNIÓN A CELULAS L/OX40

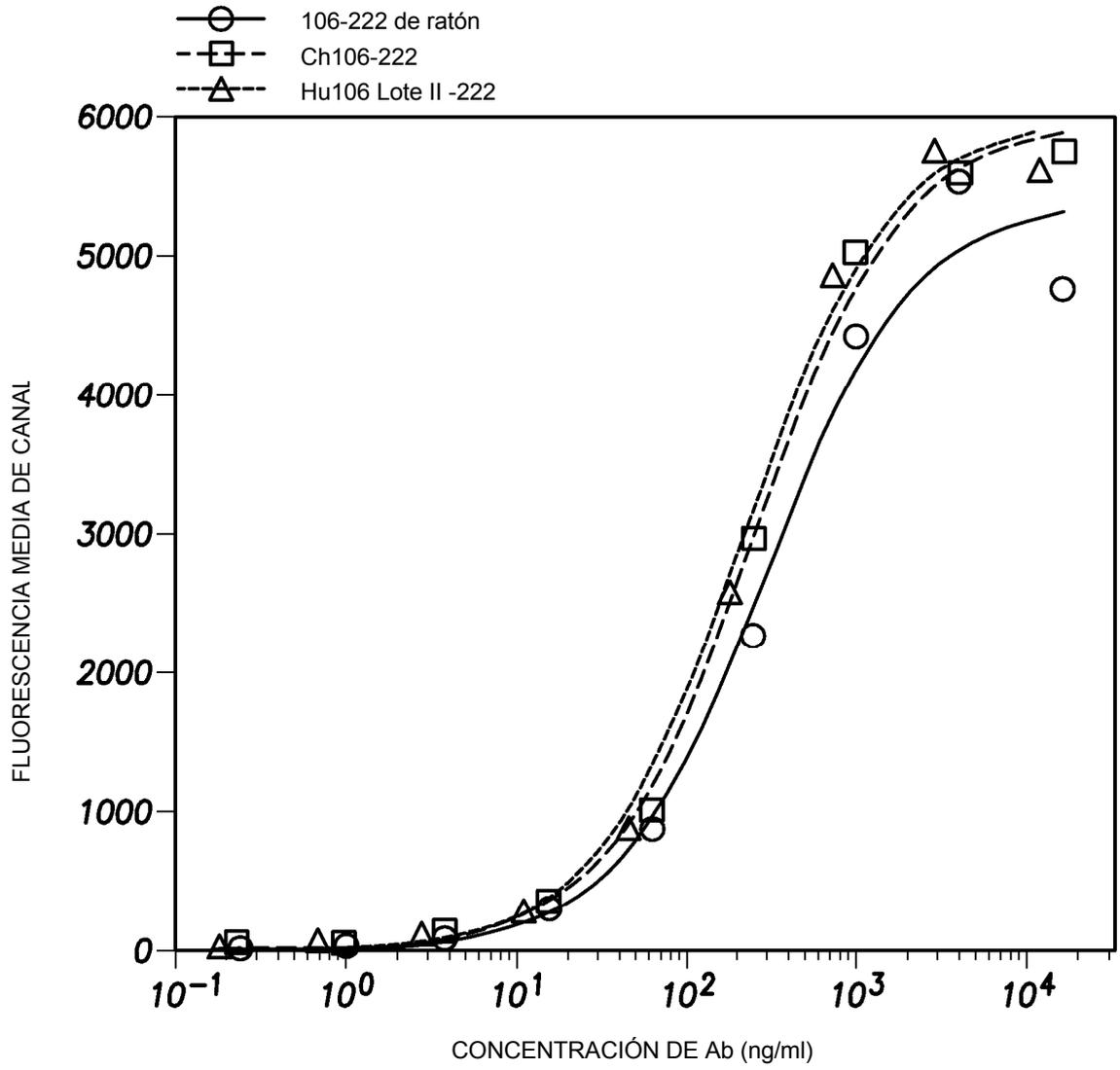


FIG.22

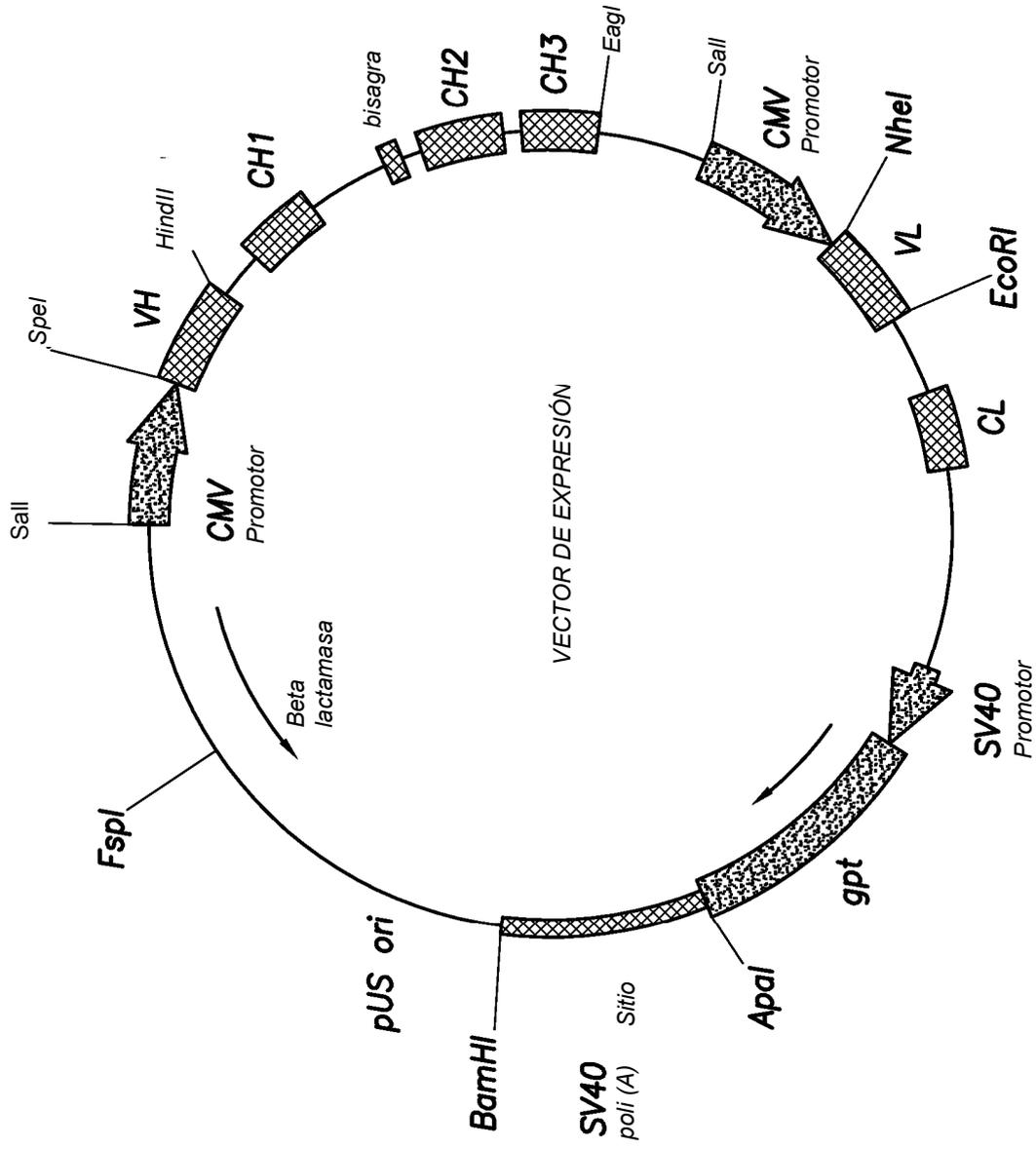


FIG.23

UNIÓN A CÉLULAS L/OX40

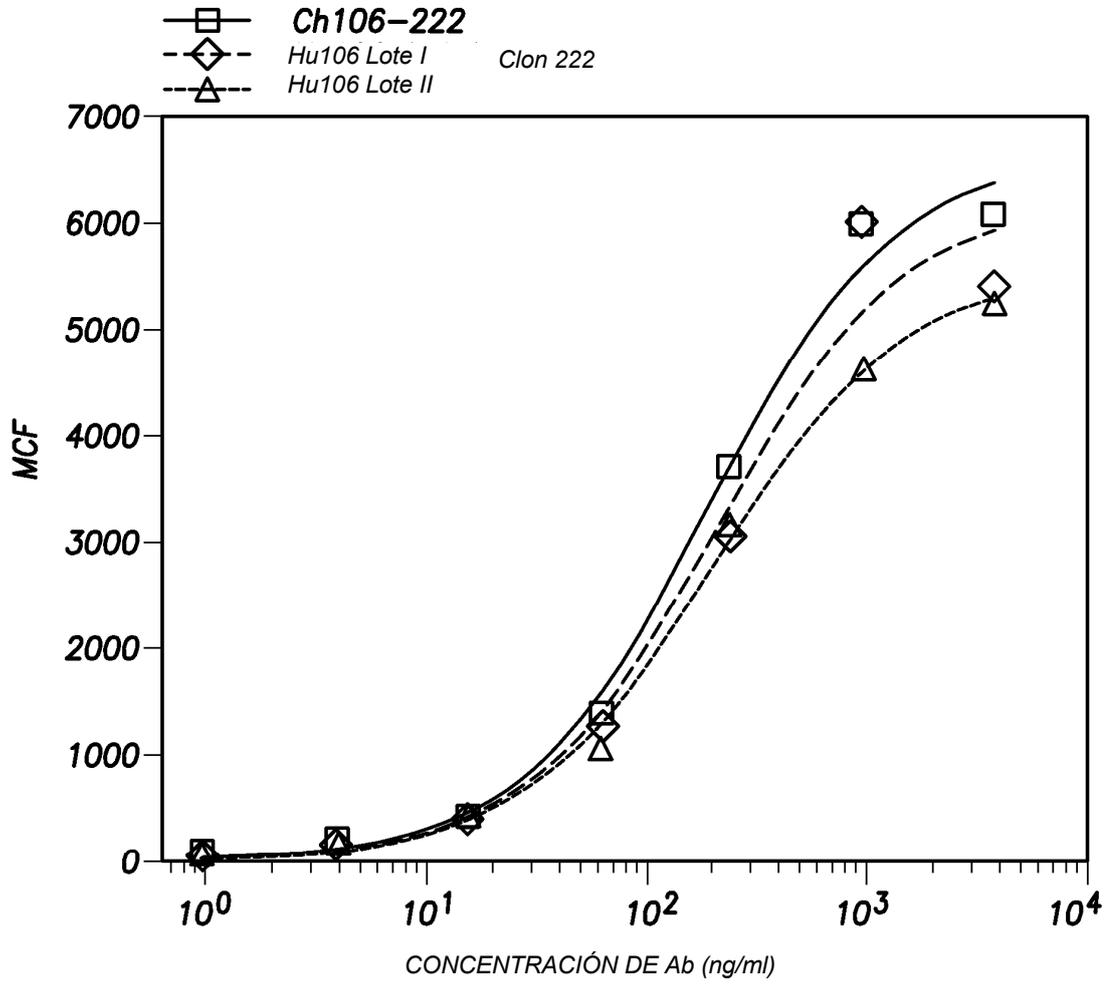


FIG.24

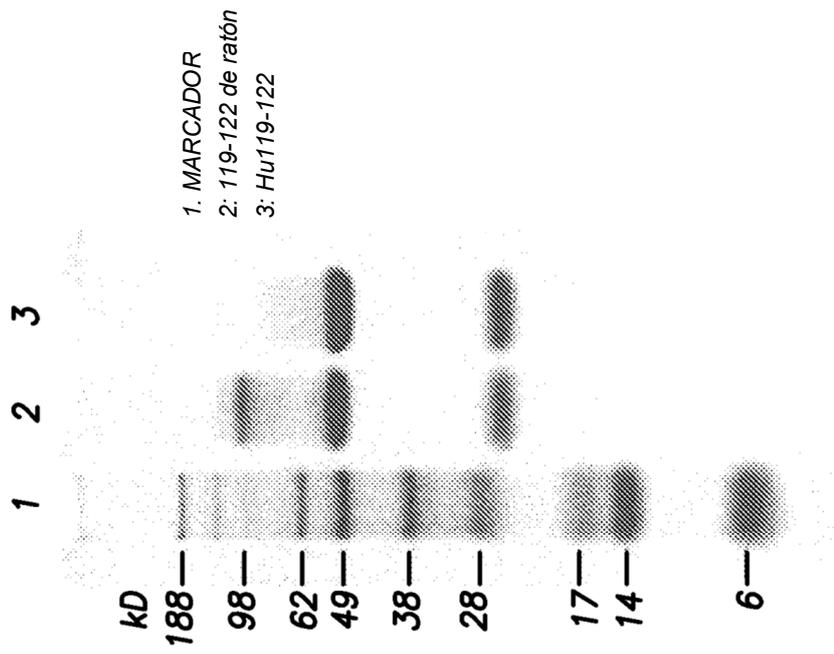


FIG.25

UNIÓN A CÉLULAS L/OX40

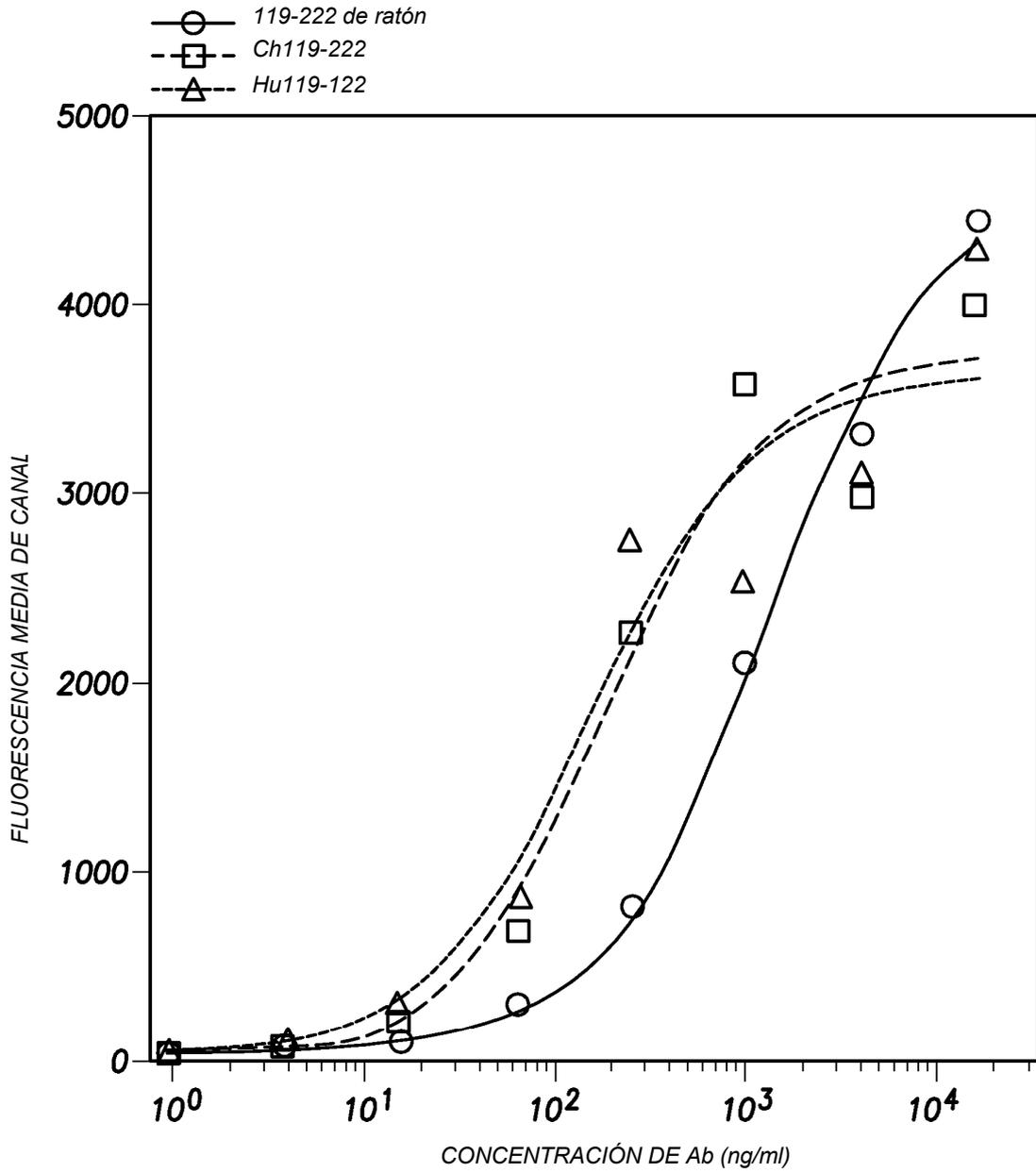
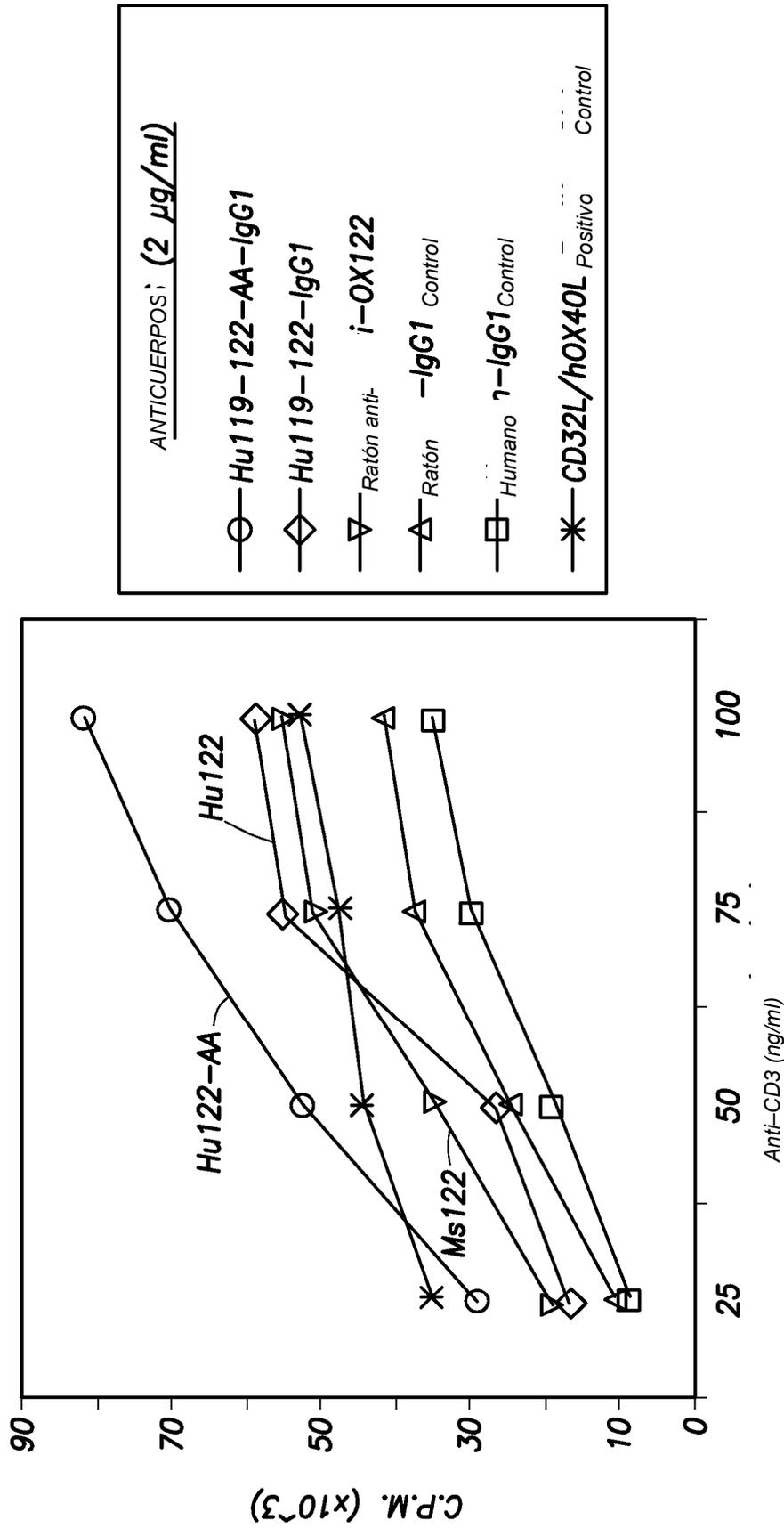
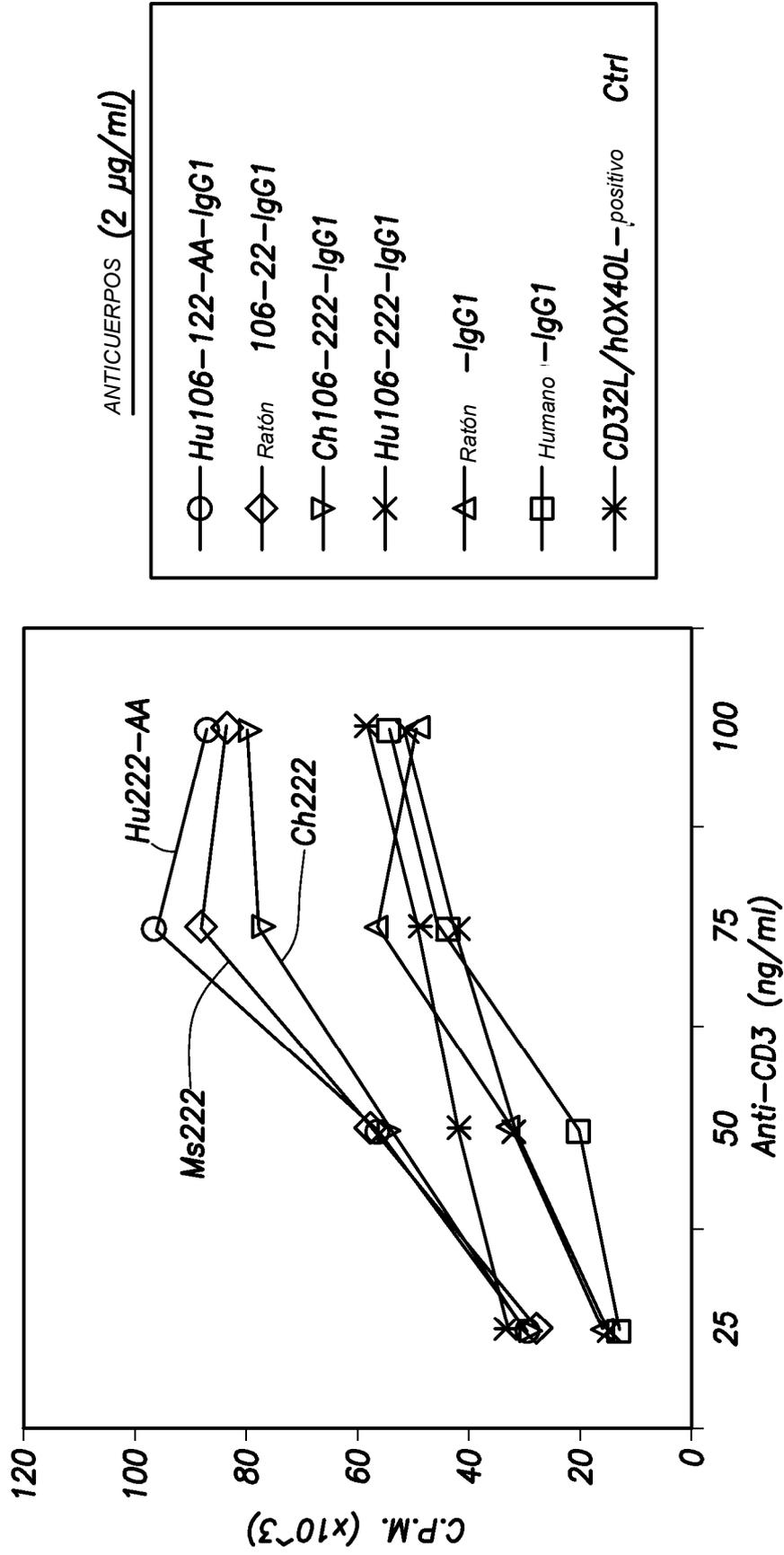


FIG.26



SISTEMA DE
CÉLULAS L

FIG. 27



SISTEMA DE CÉLULAS L

FIG.28

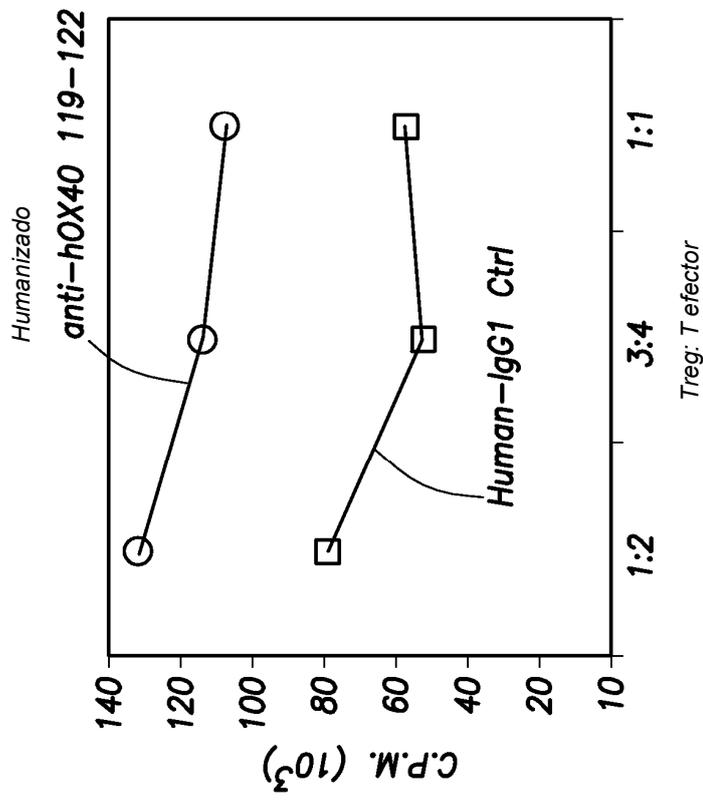


FIG.29A

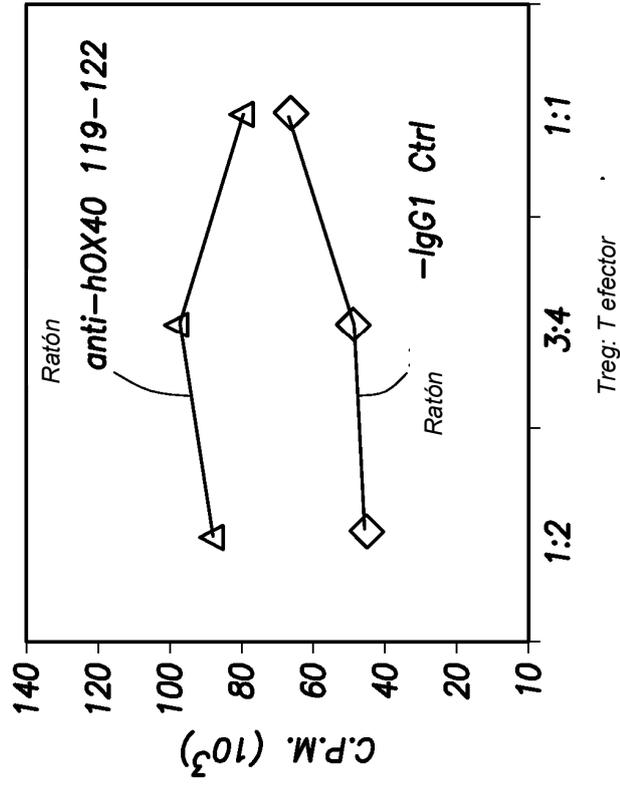


FIG.29B

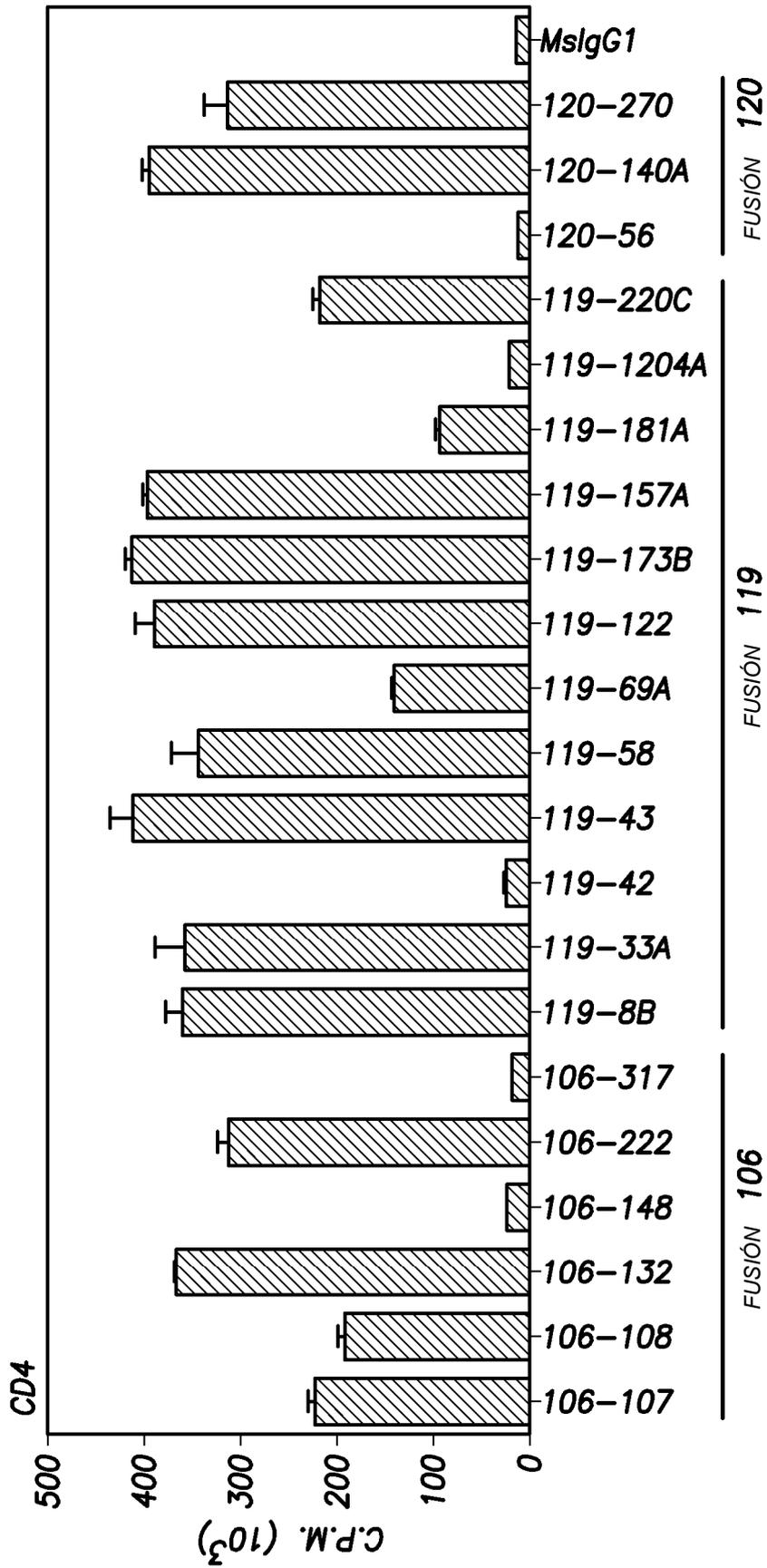


FIG.30A

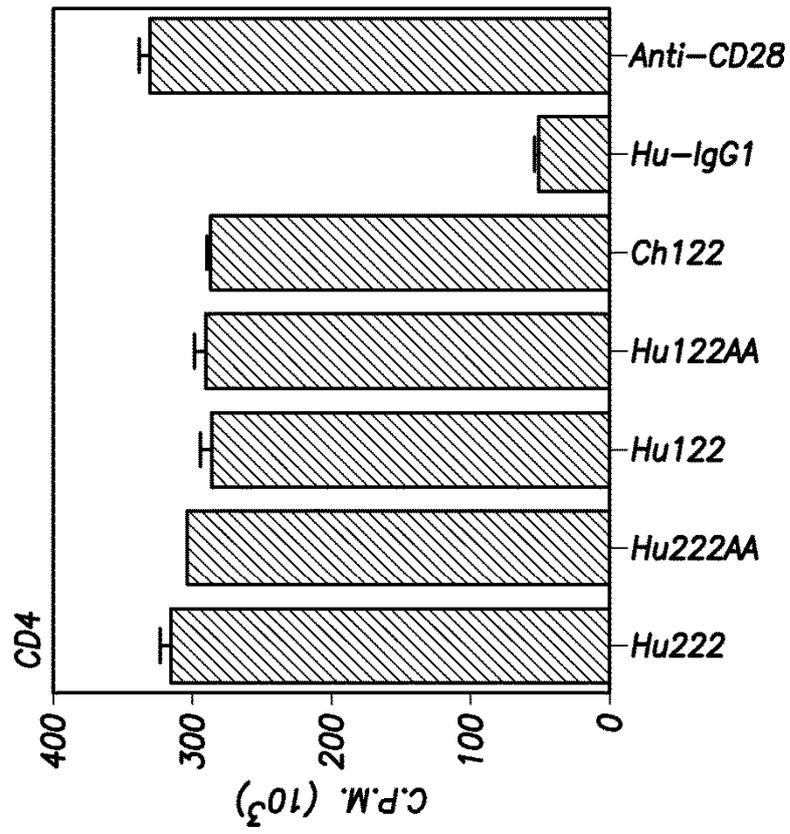


FIG.30C

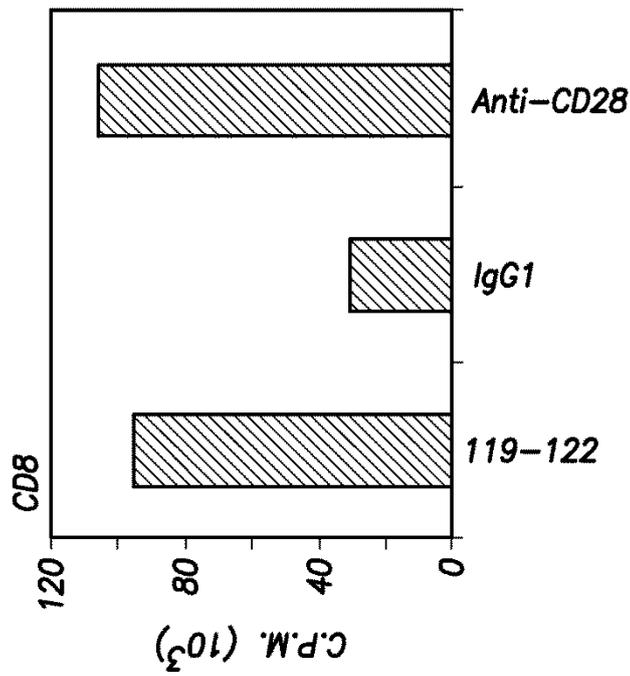


FIG.30B

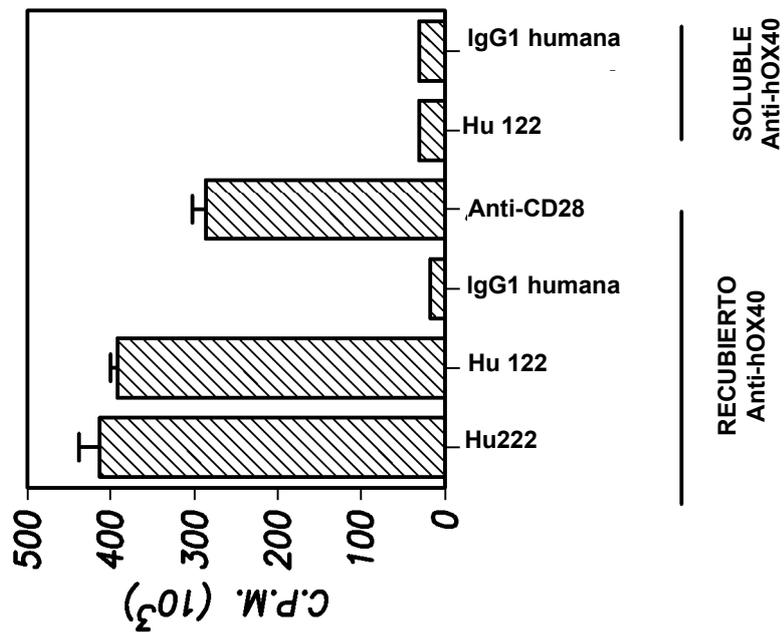


FIG.31A

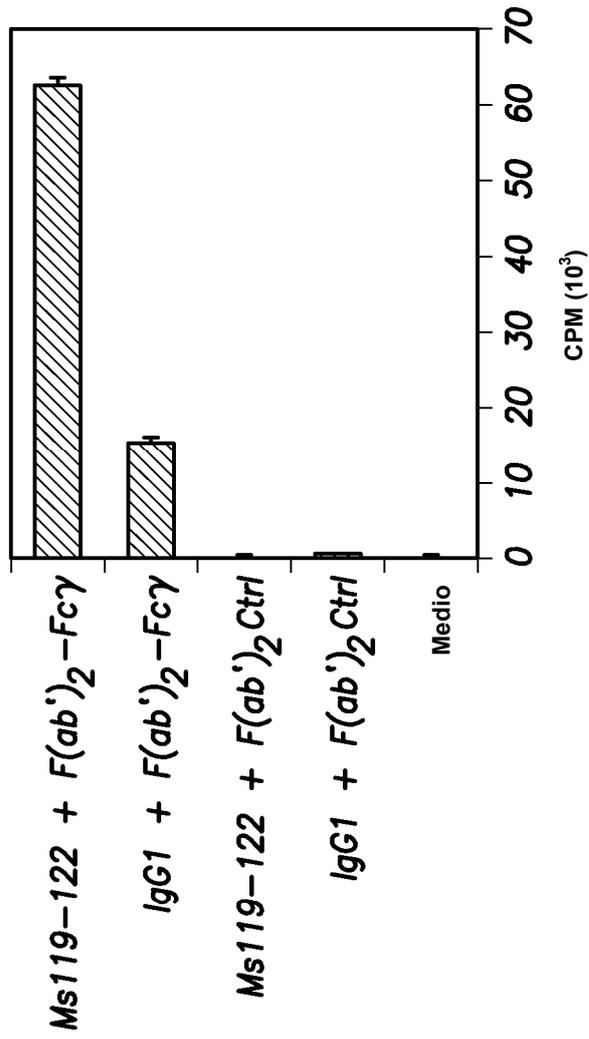


FIG.31B

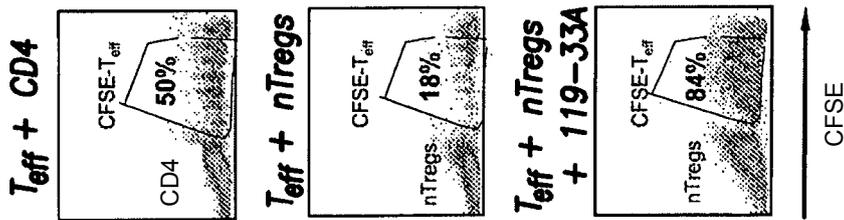
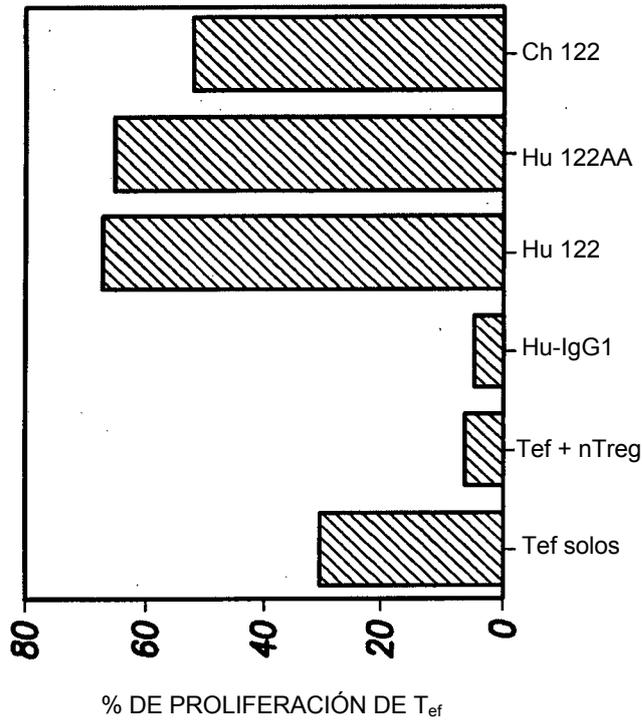
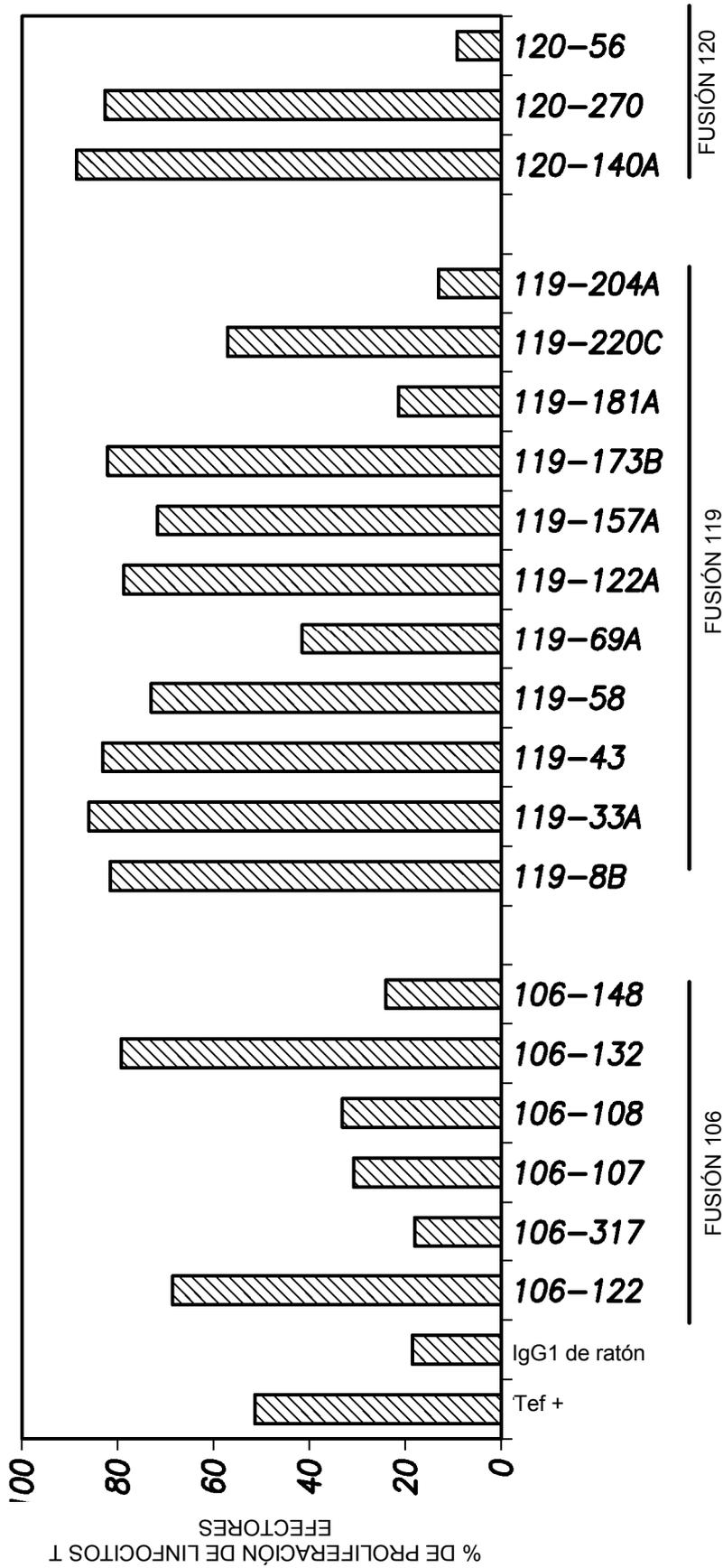


FIG.32A



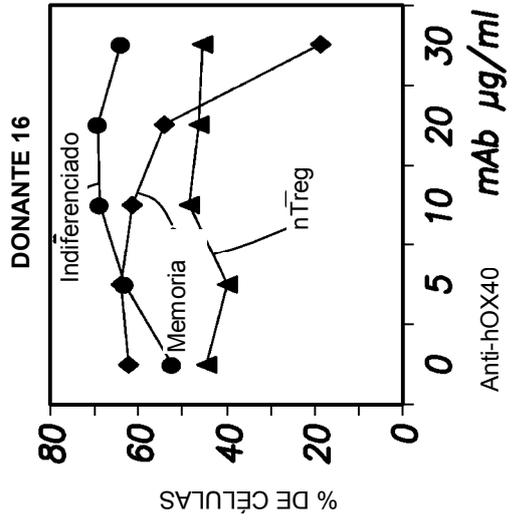
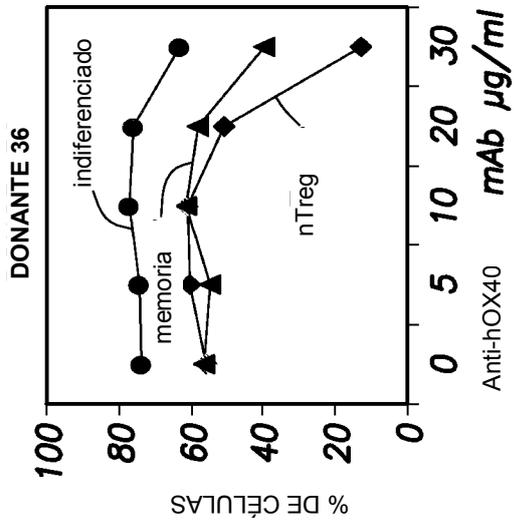
**$T_{eff} + nTregs$
 + Hu mAbs**

FIG.32C



T_{ef} + nTreg + mAb de ratón anti-hOX40

FIG.32B



- CD4 Indifer
- ▲ CD4 Memoria
- ◆ CD4 nTreg

FIG.33A

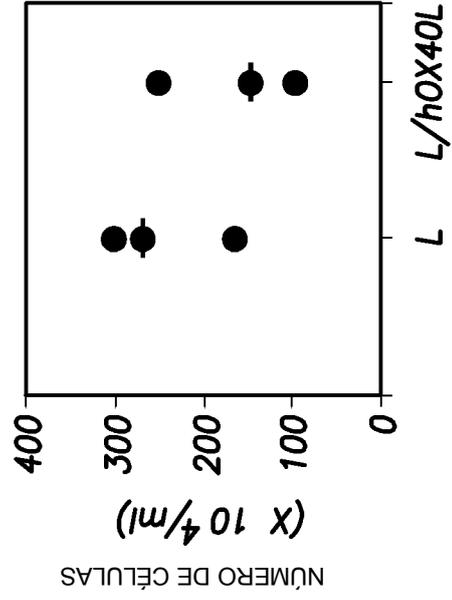


FIG.33C

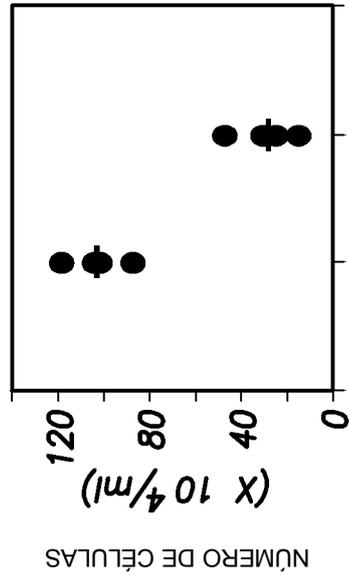


FIG.33B

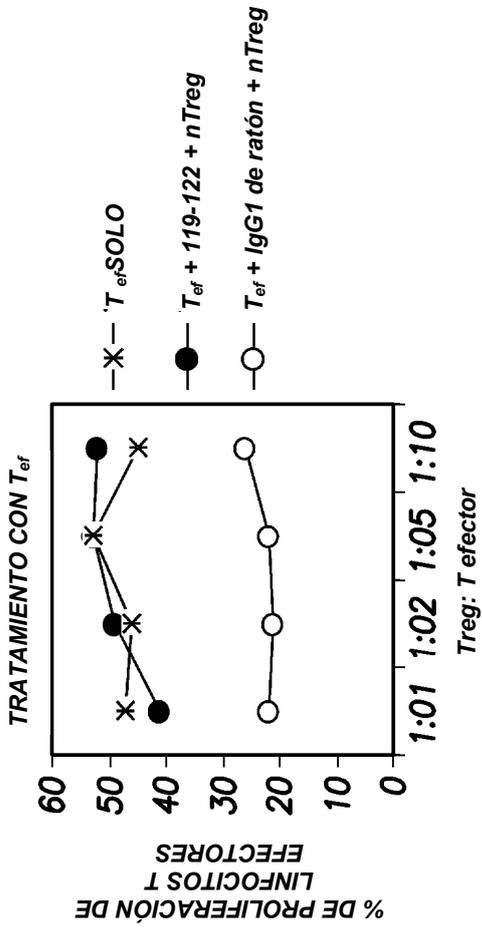


FIG.34A

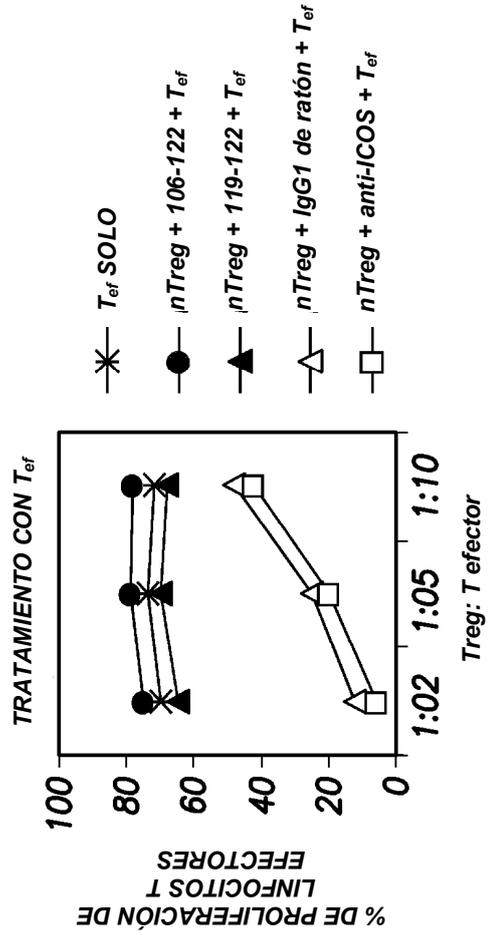


FIG.34B

ANTICUERPOS, ip TRATAMIENTO (100 µg, 50 µg, 50 µg/ratón)

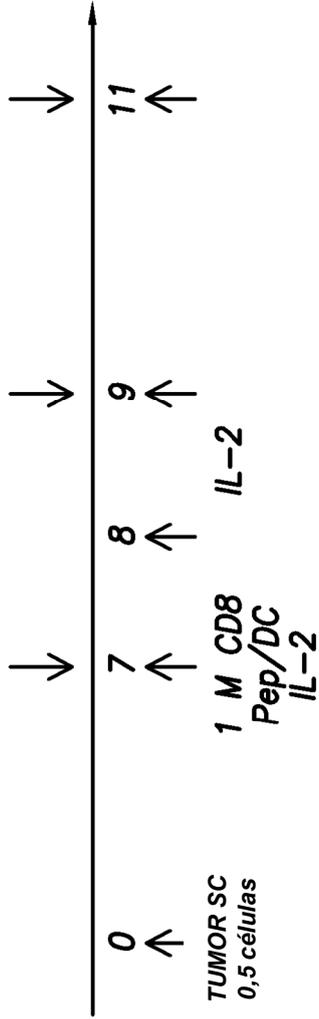


FIG.35A

LINFOCITOS T CD8⁺ Pmel-1 QUE EXPRESAN hOX40

MÁS mAb DE CONTROL DE IGG1

MÁS mAb anti-hOX40

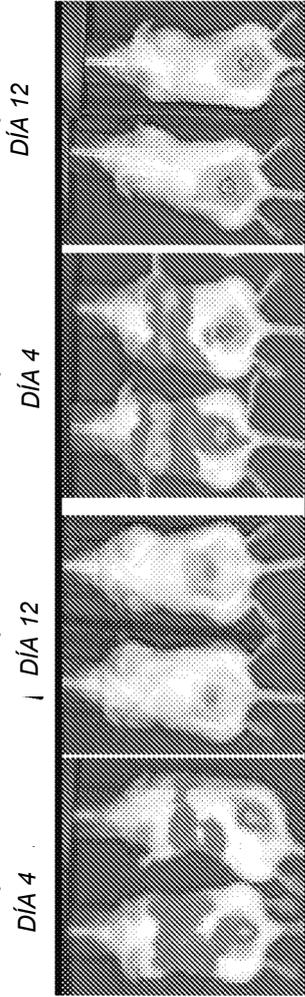


FIG.35B

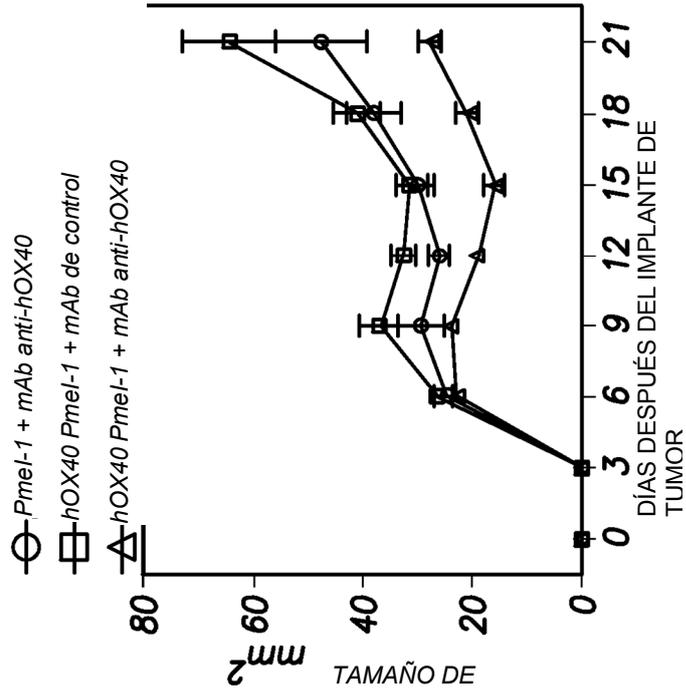


FIG.35C

106-222 VH		1	2	3	
SEQ ID No.4	106-222 VH	123456789	0123456789	0123456789	0123456789
SEQ ID No.5	Hu106 VH	QIQLVQSGP	ELKKPGETVK	ISCKASGYTF	TDYSMHHVKQ
	X61012	QVQLVQSGS	ELKKPGASVK	VSCKASGYTF	TDYSMHHVVRQ
		QVQLVQSGS	ELKKPGASVK	VSCKASGYTF	T-----WVRQ
		4	5	6	7
		0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
			a	CDR2 SEQ1D No.2	
106-222 VH		APGKGLKWMG	WINTETGEPTY	ADDFKGRFAF	SLETSASTAY
Hu106 VH		APGQGLKWMG	WINTETGEPTY	ADDFKGRFVF	SLDTSVSTAY
X61012		APGQGLEWMG	-----	-----RFVF	SLDTSVSTAY
		8	9	0	1
		012223456789	0123456789	000000123456789	0123
		abc	abcde	CDR3 de la SEQ ID No.: 3	
106-222 VH		LQINNLKNETAT	YFCANPYDY	VSYAMDYWGHGTSV	TVSS
Hu106 VH		LQISSLKAEDTAV	YYCANPYDY	VSYAMDYWGQGTTV	TVSS
X61012		LQISSLKAEDTAV	YYCAR-----	-----WGKGTTV	TVSS

FIG.36

	106-222 VL								
									CDR1 SEQ ID No.7
									1 2 3
SEQ ID No.10	106-222 VL								0123456789 0123456789 0123456789
SEQ ID No.11	Hu106 VL								FMSTSVRDRV SITCKASQDV STAVAWYQQK
	AJ388641								DIQMTQSPS SLSASVGDV TITCKASQDV STAVAWYQQK
									DIQMTQSPS SLSASVGDV TITC-----WYQQK
									CDR2 SEQ ID No.8
									4 5 6 7
									0123456789 0123456789 0123456789 0123456789
106-222 VL									PGQSPKLLIY SASLYLTGVP DRFTGSGSGT DFTFTISSVQ
Hu106 VL									PGKAPKLLIY SASLYLTGVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ
AJ388641									PGKAPKLLIY -----GVP SRFSGSGSGT DFTFTISSLQ
									CDR3 SEQ ID No.9
									8 9 1 0
									0123456789 0123456789 01234567
106-222 VL									AEDLAVYYCQ QHYSTPRTFG GGTKLEIK
Hu106 VL									PEDIATYYCQ QHYSTPRTFG GGTKLEIK
AJ388641									PEDIATYYC- -----FG GGTKLEIK

FIG.37

Hu106-222 VH

SpeI

SEQ ID No.6

ACTAGTACCACCATGGCTTGGGTGGACCTTGGCTATTCCTGATGGCAGCTGCCCAAAGT
 M A W V W T L L F L M A A A Q S

ATCCAAGCACAGGTTTCAGTTGGTGCAGTCTGGATCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGCCTCA
 I Q A Q V Q L V Q S G S E L K K P G A S

GTC AAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCTTCACAGACTATTCAATGCACCTGGGTG
 V K V S C K A S G Y T F T D Y S M H W V

CGACAGGCTCCAGGACAAGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACTGAGACTGGTGAG
 R Q A P G Q G L K W M G W I N T E T G E

CCAACATATGCAGATGACTTCAAGGACGGTTTGTCTTCTCTTTGGACACCTCTGTGAGC
 P T Y A D D F K G R F V F S L D T S V S

ACTGCCATTTGCAGATCAGCAGCCTCAAAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCT
 T A Y L Q I S S L K A E D T A V Y Y C A

AATCCCTACTATGATTACGTCTCTTACTATGCTATGGACTACTGGGTCAGGGAACCCAG
 N P Y Y D Y V S Y Y A M D Y W G Q G T T

HindIII

GTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAATGGCCTCTCAAGCTT
 V T V S S

FIG.38

Hu106-222 VL
 NheI
 SEQ ID No.12
GCTAGCACCACCATGGAGTCACAGATTCAGGTCCTTTGTATTTCGTTGTTCTCTGGTTGTCT
 M E S Q I Q V F V F V F L W L S
 GGTGTTGACGGAGACATTCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCGGCATCAGTGGGA
 G V D G D I Q M T Q S P S S L S A S V G
 GACAGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTACTGCTGTAGCCTGGTAT
 D R V T I T C K A S Q D V S T A V A W Y
 CAACAGAAACCAGGAAAGCCCTAAACTACTGATTTACTCGGCATCCTACCTCTACACT
 Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y L Y T
 GGAGTCCCTTCACGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACGGATTTACCTTTACCATCAGC
 G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S
 AGTCTGCAGCCTGAAGACATTGCAACATAATTACTGTCAGCAACATTATAGTACTCCTCGG
 S L Q P E D I A T Y Y C Q Q H Y S T P R
 ACGTTCGGTCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTAAGTAGAATCCAAGAATTC
 T F G Q G T K L E I K
 ECORI

FIG.39

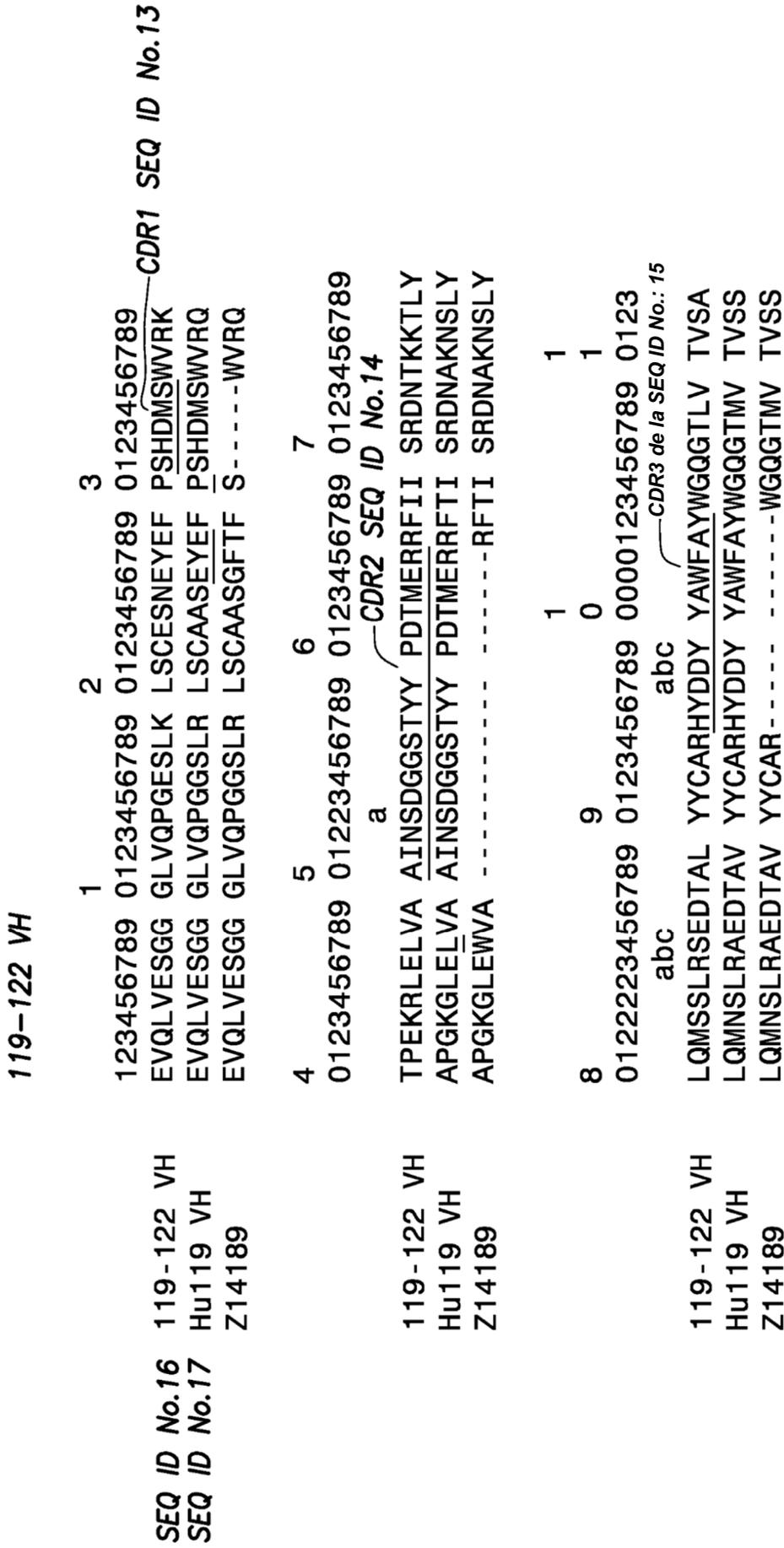


FIG.40

119-122 VL

119-122 VL
 Hu119 VL
 M29469

119-122 VL
 Hu119 VL
 M29469

119-122 VL
 Hu119 VL
 M29469

123456789 0123456789 01234567777789 0123456789
 DIVLTQSPA SLAVSLGQRA TISCRASKSVSTSG YSYMHWYQQK
 EIVLTQSPA TLSLSPGERA TLSCRASKSVSTSG YSYMHWYQQK
 EIVLTQSPA TLSLSPGERA TLSC-----
 CDR2 SEQ ID No.20
 CDR1 SEQ ID No.19
 abcd

1
 2
 3

4
 5
 6
 7

CDR3 SEQ ID No.21

8
 9
 0
 1

FIG.41

Hu119-122 VH
 SpeI
ACTAGTACCACCATGGACTTCGGGGCTCAGCTTGGTTTTCCTTGTCCTTATTTTAAAAAGT
 M D F G L S L V F L V L I L K S

GTACAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCC
 V Q C E V Q L V E S G G L V Q P G G S

CTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGAATACGAGTTCCCTTCCCATGACATGTCTTGGGTC
 L R L S C A A S E Y E F P S H D M S W V

CGCCAGGCTCCGGGAAGGGCTGGAGTTGGTCGCAGCCATTAATAGTGTGGTGTAGC
 R Q A P G K G L E L V A A I N S D G G S

ACCTACTATCCAGACACCCATGGAGAGACGATTACCACATCTCCAGAGACAAATGCCAAGAAC
 T Y Y P D T M E R R F T I S R D N A K N

TCACTGTACCTGCAAAATGAACAGTCTGAGGGCCGAGGACACAGCCGTGTATTACTGTGCA
 S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A

AGACACTATGATGATTACTACGCCCTGGTTTGGCTTACTGGGGCCAGGGACTATGGTCACT
 R H Y D D Y Y A W F A Y W G Q G T M V V T

GTCTCTTCAGGTGAGTCCTAACTTCAAGCTT
 V S S

HindIII
GTCTCTTCAGGTGAGTCCTAACTTCAAGCTT

FIG.42

SEQ ID No.18

119-122 VL

NheI

SEQ ID No.24
GCTAGCACCACCATGGAGACAGACACTCCTGTTATGGGTACTGCTCTGGGTTCCA
 M E T D T L L L W V L L L W V P

GGTTCCACTGGTGA^{AA}TTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTTTGTCTCCAGGG
 G S T G E I V L T Q S P A T L S L S P G

GAAAGGCCACCCTCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAATCATCTGGCTATAGTTAT
 E R A T L S C R A S K S V S T S G Y S Y

ATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGGCTCCAGACTCCTCATCTATCTTGCATCC
 M H W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y L A S

AACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACC
 N L E S G V P A R F S G S G S G T D F T

CTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAGGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCACAGTAGG
 L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q H S R

GAGCTTCGGCTCAGGTTCCGGGGAGGCCAAGGTCGAGATCAAAACGTAAGTACACTTTT
 E L P L T F G G G T K V E I K

EcoRI
CTGAATTC

FIG.43